

**U. PORTO**



**FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO**

# **Automatização de ensaios enzimáticos usando a análise por injecção sequencial**

**André Ricardo Tomás dos Santos Araújo Pereira**

**Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducentes ao Grau de Doutor em  
Ciências Farmacêuticas com especialização em Química Analítica**

*Trabalho realizado sob a orientação da  
Professora Doutora Maria Lúcia Marques Ferreira de Sousa Saraiva  
e co-orientação do  
Professor Doutor José Luís Fontes da Costa Lima*

Porto  
Fevereiro de 2011

É autorizada a reprodução integral desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

---

André Ricardo Tomás dos Santos Araújo Pereira

# FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR







*Dedico esta tese à memória do meu pai.*

*À minha mãe e ao meu irmão.*

*À Catarina, por existir. ☯*



## **Agradecimentos**

Ao Professor Costa Lima agradeço o convite e a oportunidade de me ter acolhido no grupo de investigação de Química-Física, bem como de ter sido co-orientador do trabalho aqui apresentado.

À Professora Lúcia Saraiva agradeço o facto de ter sido a minha orientadora e de me ter acompanhado ao longo destes anos. Foi um privilégio ter iniciado consigo a estrada da investigação e agradeço-lhe todos os ensinamentos transmitidos e de me ter concedido autonomia, apoio e a sua amizade.

A todos os docentes da faculdade que, de uma forma ou outra, me ajudaram a crescer em sabedoria e humanidade. Agradeço em especial aos professores do nosso departamento, em especial ao Professor João Santos, pelo companheirismo, e à Professora Salette pela amizade, presença e colaboração num dos trabalhos da tese. Uma palavra de grande estima para o Professor Carlos Afonso, porque despertou em mim o sentimento de investigação, pelo exímio exemplo que representa, pela grande amizade que nutro e pela disponibilidade que sempre manifestou.

Ao Professor Victor Cerda por me ter acolhido no seu laboratório em Palma de Mallorca, pela ajuda e amizade demonstradas, bem como ao Professor José Manuel Estela a simpatia, a camaradagem e a supervisão do trabalho desenvolvido.

A todos os meus colegas do serviço de Química-Física, desde as gerações anteriores até à actual, pelo companheirismo, pela ajuda e pela presença. Ao David Ribeiro, a quem considero como um irmão, pela aventura, ajuda, partilha e preocupação constante. Ao Rodrigo, pela ajuda prestada ao longo destes anos, pela amizade e pela integridade sempre demonstrada. Uma palavra de estima para a Marlene, pela presença e pela atenção sempre demonstradas e pela ajuda em momentos mais difíceis. Uma palavra de carinho para a Eunice, pela forma tão especial como sempre me tratou, pelos momentos partilhados e pelo sentimento de amizade eterno.

À Engenheira D. Manuela o pronto-socorro, a boa disposição e a simpatia sempre demonstradas.

A todos os colegas além-fronteiras que enriqueceram muito o nosso laboratório. Um abraço em especial aos cabras Josué, José Rufino e Prof. Júnior, do Brasil, e ao Daniel e à Vanesa de Valência.

A todos os colegas do laboratório de Palma pela forma como me receberam, como partilharam a minha estadia e a forma como se despediram. Agradeço a oportunidade de ter embarcado nesta experiência. Um abraço especial ao Fernando, pela amizade e ajuda constantes e o facto de ter sido decisivo no trabalho desenvolvido e ao

Carlos, pelo companheirismo. Um beijo especial para a Mailén, Jessica, Ruth e Camélia, pelo carinho sempre demonstrado. Uma palavra sentida ao meu amigo Matias, pela experiência partilhada no Porto, pelo “suporte humano” em Palma e pela amizade verdadeira, recíproca e eterna.

A todos os meus amigos, que se cruzaram nesta longa caminhada, que mesmo não estando presentes, foram muitos importantes e me fizeram evoluir como Homem.

A toda a minha família, em especial aos meus padrinhos e primos, aos meus pais e ao meu irmão. Aos meus padrinhos Alfredo e Aurora, por me terem acompanhado desde sempre e aos meus primos Hugo e Luís por representarem uma fonte de alegria, inspiração e carinho constante. Aos meus pais Rodrigo e Rosa, por tudo o que sempre fizeram e fazem por mim, pelo amor e carinho, pela dedicação contínua...simplesmente ao meu grande pai por tudo o que representa, que certamente seria das pessoas mais felizes se estivesse entre nós. À minha grande mãe, que este momento represente algum reconforto nesta fase da vida, alegria e orgulho por termos chegado até aqui. Ao meu mano Jorge, os ensinamentos desde pequeno, a partilha ao longo desta caminhada, o carinho, a preocupação de irmão e a motivação.

Agradeço também à família da Catarina, em especial aos meus sogros Manuel Joaquim e Guiomar, pela motivação e ajuda permanentes, e ao meu cunhado Rafael, por ter preenchido o nosso espaço com alegria e boa disposição, pela companhia e pela amizade construída.

Por último agradeço à minha esposa Catarina, a quem dedico esta tese. Primeiro, porque foi quem me incentivou a optar por este caminho. Depois, pela companhia, paciência e motivação que sempre demonstrou. Pela esperança que sempre teve, nos momentos mais difíceis. Pela força e dedicação que me transmitiu para encerrar esta etapa da vida. Por último, pela esposa que é e pela mãe que virá a ser. O meu sincero obrigado.

## Resumo

Neste trabalho, foram exploradas as potencialidades da associação da biocatálise com as vantagens inerentes da automatização recorrendo ao conceito de análise por injeção sequencial. O conjunto de procedimentos enzimáticos automáticos desenvolvidos serviu de base ao surgimento de alternativas válidas e economicamente viáveis na resolução de problemas a nível clínico, farmacêutico, alimentar e ambiental. Em cada situação analítica foram avaliadas as condições que melhor se coadunavam com a acção biocatalítica das enzimas e seleccionadas as condições óptimas de operação dos sistemas de fluxo, visando a obtenção de módulos analíticos que viabilizassem a realização dos ensaios em ambiente confinado e controlado de forma estrita, com elevada eficiência, precisão e rapidez, mantendo os consumos e os efluentes gerados a um valor mínimo.

As montagens desenvolvidas contemplaram o emprego das enzimas em duas vertentes diferentes: como ferramentas bioanalíticas, para a determinação de substrato, produto ou activador/inibidor, ou como analitos, para a avaliação da actividade enzimática e sua inibição.

Foi implementado um sistema para a determinação dos substratos glutathione reduzida e oxidada em amostras de sangue humano, baseado num ensaio de amplificação da resposta à glutathione com a utilização do cromógeno ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) e da enzima glutathione reductase.

Desenvolveu-se um sistema em que se propôs uma nova abordagem para a determinação do metanol em amostras de biodiesel. Com a injeção directa das amostras de biodiesel através de uma válvula de injeção e após passagem numa unidade de extracção membranar, o metanol extraído era determinado em meio aquoso, usando um sistema bioenzimático constituído pela álcool oxidase imobilizada e pela peroxidase em solução.

Propõe-se uma montagem para a avaliação da actividade enzimática da fosfolipase  $A_2$  e do efeito inibitório de diferentes anti-inflamatórios sobre esta, com a utilização de lipossomas como ambiente reaccional. Avaliaram-se as vantagens da incorporação de câmaras de mistura no sistema, ao criaram-se condições favoráveis para a monitorização da mudança do ambiente hidrofóbico em redor da sonda de fluorescência interfacial empregue, causada pelo desenvolvimento da reacção enzimática seleccionada.

Avaliou-se a actividade enzimática da tirosinase em meios reacionais contendo líquido iónico através da determinação dos parâmetros cinéticos da reacção de oxidação

do ácido caféico, confirmando estes meios reaccionais como alternativas vantajosas aos solventes orgânicos convencionais para estudos biocatalíticos. Adicionalmente, foi estudado o comportamento de substratos análogos ao ácido caféico como inibidores da reacção catalisada pela tirosinase.

Foi igualmente desenvolvida uma metodologia hifenizada SIA-MSFIA para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos na reacção de quimiluminescência baseada na oxidação do luminol, catalisada pela peroxidase. A utilidade analítica do sistema proposto foi demonstrada na determinação do índice polifenólico e do teor de fenol em vinhos e águas, respectivamente.

As metodologias automáticas propostas forneceram resultados estatisticamente comparáveis aos obtidos usando o método de referência aplicável ou convencional de comparação, quando estes existiam. Adicionalmente, as vantagens e limitações dos sistemas propostos são discutidas.

**Palavras-chave:** Análise por injeção sequencial (SIA); enzimas; substrato; cinética; inibição enzimática.

## Abstract

In this work the potentialities of the assembly of biocatalysis with the inherent advantages obtained by means of automatization resorting to the sequential injection analysis concept were exploited. The developed automatic enzymatic procedures showed to be valuable and economical alternative solutions in several application fields, ranging from clinical, pharmaceutical, food to environmental ones. In each analytical case it were optimized the best conditions for the biocatalytic action of the enzymes and selected the optimal values for the flow systems operation, with the aim of obtaining analytical modules that enabled the assays to be performed in a closed and strictly controlled environment, with high efficiency, precision and within a shorter timeframe, while minimising reagents consumption and subsequent effluent generation.

The developed manifolds encompass the use of the enzymes in two categories: as bioanalytical tools, with the aim of determining the substrate, product or enhancer/inhibitor, or as analytes for the enzyme activity and inhibition determination.

An analytical system for the determination of the reduced and oxidized glutathione substrates in human whole blood samples was implemented, based on the glutathione recycling system with the combined use of the GSSG reductase enzyme and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

A new approach for carrying out the methanol quantification in biodiesel samples was proposed. With the direct injection of the biodiesel samples by means of an injection valve and its propulsion through a membrane-based extraction unit, the extracted methanol was determined in an aqueous environment, using a bienzymatic system composed by the immobilized alcohol oxidase and soluble peroxidase.

A manifold for the evaluation of phospholipase  $A_2$  activity and the assessment of the inhibitory effect of different anti-inflammatory drugs on its activity, using liposomes as reaction medium, was conceived. The advantages of placing mixing chambers in the manifold, enabling favourable conditions to be created for an environmental shift to occur around the interfacial fluorescence probe due to the hydrolytic action of phospholipase  $A_2$  on phospholipids, were evaluated.

The enzymatic activity of tyrosinase in reaction media containing ionic liquid was assessed by the determination of kinetic parameters for the reaction of oxidation of the poorly-water soluble substrate caffeic acid, supporting these reaction media as advantageous alternatives to the conventional organic solvents for kinetic studies of biocatalytic processes. Additionally, the behaviour of substrates analogues of caffeic acid as potential tyrosinase inhibitors was estimated.

A hyphenated SIA-MSFIA system for the assessment of the effect of different phenolic derivatives on the peroxidase-catalysed luminol chemiluminescence reaction was developed. The analytical usefulness of the proposed system was demonstrated in the polyphenol index and phenol content determination in wine and water samples, respectively.

Finally, the results obtained by the developed automatic methodologies were similar to those reported in the literature as well as statistically comparable with those furnished by batch procedures. The advantages and limitations of the proposed flow systems are also discussed.

**Keywords:** Sequential injection analysis (SIA); enzymes; substrate; kinetic; inhibition.



## Resumen

En este trabajo, se investigó el potencial de la combinación de la biocatálisis con las inherentes ventajas de los sistemas automatizados, mediante el uso de sistemas de análisis por inyección secuencial. El conjunto de procedimientos enzimáticos automáticos desarrollados sirvió de base para la aparición de alternativas válidas y económicamente viables para la resolución de problemas a nivel clínico, farmacéutico, alimentario y ambiental. En cada situación analítica se evaluaron las condiciones que mejor se adaptaban a la acción biocatalítica de las enzimas y se seleccionaron las condiciones óptimas de operación de los sistemas en flujo, con el fin de obtener procedimientos analíticos que posibilitasen la realización de ensayos en ambientes confinados y controlados de forma estricta, con una elevada eficiencia, precisión y rapidez, minimizando tanto el consumo de reactivos como la generación de desechos.

Los montajes desarrollados contemplaron el uso de enzimas de dos modos diferentes: como herramienta bioanalítica, para la determinación de sustrato, producto o activador/inhibidor, o como analitos, para evaluar su actividad enzimática y su inhibición.

Se implementó un sistema para la determinación de los sustratos glutatión reducido y oxidado en muestras de sangre humana, basado en el ensayo de amplificación de la respuesta de la glutatióna mediante la utilización del cromóforo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico y la enzima glutatióna reductasa.

Se desarrolló un sistema en el que se propone un nuevo enfoque para la determinación de metanol en muestras de biodiesel. Mediante la inyección directa de las muestras de biodiesel, usando para ello una válvula de inyección y el posterior paso por una unidad de extracción de membrana, el metanol extraído en medio acuoso se determinó, mediante un sistema bienzimático constituido por la alcohol oxidasa inmovilizada y la peroxidasa en disolución.

Se propuso un montaje para la evaluación de la actividad enzimática de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y el efecto inhibitorio de diferentes antiinflamatorios sobre esta, mediante el uso de liposomas como medio de reacción. Se evaluaron las ventajas de la incorporación de cámaras de mezcla en el montaje, creándose las condiciones favorables para la monitorización, mediante el uso de una sonda de fluorescencia interfacial, del cambio del medio hidrofóbico envolvente causado por la reacción enzimática seleccionada.

Se evaluó la actividad enzimática de la tirosinasa en medios de reacción que contenían líquidos iónicos mediante la determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de oxidación del ácido caféico, confirmando que en estudios biocatalíticos estos medios de reacción son una alternativa ventajosa con respecto a los medios orgánicos

convencionales. Adicionalmente, se estudió el comportamiento de substratos análogos al ácido caféico como inhibidores de la reacción catalizada por la tirosinasa.

Finalmente se desarrolló una metodología SIA-MSFIA para la evaluación del efecto de diferentes derivados fenólicos en la reacción de quimioluminiscencia basada en la oxidación del luminol, catalizada por la peroxidasa. Este sistema se utilizó para la determinación del índice de polifenoles y del contenido de fenol en vinos y agua, respectivamente.

Las metodologías automáticas propuestas suministraron resultados estadísticamente comparables a los obtenidos usando métodos de referencia aplicables o convencionales de comparación, cuando estos existían. Adicionalmente, se discutieron las ventajas y limitaciones de los sistemas propuestos.

**Palabras clave:** Análisis por inyección secuencial (SIA); enzimas; substrato; cinética; inhibición enzimática.

## Índice geral

<i>Agradecimentos</i>	vii
<i>Resumo</i>	ix
<i>Abstract</i>	xi
<i>Resumen</i>	xiii
<i>Índice geral</i>	xv
<i>Índice de figuras</i>	xxi
<i>Índice de tabelas</i>	xxv
<i>Lista de abreviaturas</i>	xxvii
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	1
1.1. Métodos automáticos de análise	3
1.1.1. Análise por injeção sequencial.	6
1.1.1.1. Fundamentos e características	6
1.1.1.2. Componentes	7
1.1.1.3. Dispersão e sobreposição de zonas	10
1.2. Associação dos ensaios enzimáticos à análise por injeção sequencial	14
1.2.1. Emprego das enzimas como reagentes bioanalíticos	18
1.2.1.1. Utilização das enzimas imobilizadas	19
1.2.1.1.1. Sistemas SIA com reactores enzimáticos	22
1.2.1.1.2. Sistemas SIA baseados em biosensores enzimáticos.	29
1.2.1.2. Utilização das enzimas livres em solução	33
1.2.2. Emprego das enzimas em ensaios de actividade e inibição enzimática	40
1.3. Enquadramento geral e objectivos propostos	44
1.4. Referências bibliográficas	45
<b>Capítulo 2 – Parte experimental</b>	55
2.1. Introdução	57
2.2. Reagentes e soluções	57
2.3. Instrumentação	58
2.3.1. Equipamento auxiliar	58
2.3.2. Sistemas de fluxo	59
2.3.2.1. Unidades de aspiração/propulsão	59
2.3.2.2. Dispositivos de selecção de fluidos	61

2.3.2.3. Tubagem e outros componentes das montagens . . . . .	63
2.3.2.4. Registo e aquisição do sinal analítico . . . . .	66
2.3.2.5. Controlo informático dos sistemas . . . . .	67
2.4. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento dos métodos desenvolvidos . . . . .	68
2.5. Tratamento estatístico dos resultados . . . . .	70
2.6. Referências bibliográficas . . . . .	71

**Capítulo 3 – Determinação da glutathiona reduzida e glutathiona oxidada em sangue total . . . . .**

3.1. Introdução . . . . .	75
3.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a determinação da glutathiona reduzida e oxidada em amostras de sangue . . . . .	75
3.2. Material e métodos . . . . .	80
3.2.1. Reagentes e soluções . . . . .	80
3.2.2. Colheita da amostra e processamento . . . . .	81
3.2.3. Aparelhagem . . . . .	81
3.2.4. Metodologia convencional de comparação . . . . .	83
3.2.5. Procedimento experimental . . . . .	84
3.3. Resultados e sua discussão . . . . .	86
3.3.1. Optimização do sistema . . . . .	87
3.3.2. Análise de amostras de sangue humano . . . . .	91
3.3.3. Estudo de interferentes . . . . .	94
3.3.4. Figuras de mérito e validação do método desenvolvido . . . . .	95
3.4. Conclusões . . . . .	99
3.5. Referências bibliográficas . . . . .	101

**Capítulo 4 – Determinação do teor de metanol em amostras de biodiesel com extracção líquido-líquido por membrana . . . . .**

4.1. Introdução . . . . .	109
4.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a determinação do metanol em amostras de biodiesel . . . . .	109
4.2. Material e métodos . . . . .	113
4.2.1. Reagentes e soluções . . . . .	113
4.2.1.1. Reagentes usados no processo de imobilização . . . . .	113
4.2.1.2. Procedimento de imobilização . . . . .	113

4.2.2. Aparelhagem	114
4.2.3. Metodologia convencional de comparação	116
4.2.4. Procedimento experimental	118
4.3. Resultados e sua discussão	119
4.3.1. Optimização do sistema	119
4.3.2. Análise das amostras de biodiesel	127
4.4. Conclusões	129
4.5. Referências bibliográficas	130

**Capítulo 5 – Avaliação do efeito dos anti-inflamatórios não-esteróides sobre a actividade da fosfolípase  $A_2$  utilizando lipossomas**

5.1. Introdução	135
5.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a avaliação do efeito dos anti-inflamatórios não-esteróides na actividade da fosfolípase $A_2$ usando lipossomas como modelos membranares	135
5.2. Material e métodos	138
5.2.1. Reagentes e soluções	138
5.2.2. Preparação dos lipossomas	138
5.2.3. Aparelhagem	139
5.2.4. Método discreto de comparação	141
5.2.5. Procedimento experimental	141
5.3. Resultados e sua discussão	144
5.3.1. Optimização do sistema	144
5.3.2. Aplicação do método desenvolvido para avaliar o efeito inibitório dos AINEs e do ácido lipóico na actividade da PLA <sub>2</sub>	147
5.3.3. Validação dos resultados obtidos pelo método desenvolvido com os fornecidos pelos ensaios realizados em modo discreto	149
5.4. Conclusões	151
5.5. Referências bibliográficas	153

**Capítulo 6 – Avaliação da cinética da oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas contendo líquido iónico**

6.1. Introdução	159
6.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a avaliação da cinética da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em meio de líquido iónico	159

<b>6.2. Material e métodos</b>	162
<b>6.2.1. Reagentes e soluções</b>	162
<b>6.2.2. Aparelhagem</b>	163
<b>6.2.3. Procedimento experimental</b>	164
<b>6.2.3.1. Determinação das velocidades de reacção</b>	164
<b>6.3. Resultados e sua discussão</b>	166
<b>6.3.1. Optimização do sistema</b>	167
<b>6.3.1.1. Ordem de aspiração e volume de solução enviado para o detector</b>	168
<b>6.3.1.2. Concentração de enzima</b>	169
<b>6.3.1.3. pH e temperatura reaccional</b>	170
<b>6.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico</b>	172
<b>6.3.3. Avaliação do efeito dos inibidores sobre a actividade difenolase da tirosinase em sistemas aquosos contendo LI</b>	175
<b>6.4. Conclusões</b>	178
<b>6.5. Referências bibliográficas</b>	179
 <b>Capítulo 7 – Avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase</b>	183
<b>7.1. Introdução</b>	185
<b>7.1.1. Desenvolvimento de uma metodologia automática para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de quimiluminescência composto por luminol, peróxido de hidrogénio e peroxidase</b>	185
<b>7.2. Material e métodos</b>	187
<b>7.2.1. Reagentes e soluções</b>	187
<b>7.2.2. Aparelhagem</b>	188
<b>7.2.3. Metodologias convencionais de comparação</b>	189
<b>7.2.4. Procedimento experimental</b>	190
<b>7.3. Resultados e sua discussão</b>	192
<b>7.3.1. Optimização do sistema</b>	192
<b>7.3.1.1. Parâmetros físicos</b>	192
<b>7.3.1.2. Parâmetros químicos</b>	194

7.3.2. Aplicação da metodologia SIA-MSFIA desenvolvida à avaliação do efeito dos derivados fenólicos sobre o sistema luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD . . . . .	196
7.3.3. Determinação do teor de compostos fenólicos em matrizes alimentares e ambiental . . . . .	200
7.4. Conclusões . . . . .	207
7.5. Referências bibliográficas . . . . .	208
<b>Capítulo 8 – Conclusões gerais . . . . .</b>	<b>213</b>





## Índice de figuras

### Capítulo 1 – Introdução

<b>Figura 1.1.</b> Esquema básico de uma montagem de um sistema de análise por injeção sequencial (parte superior). Representação esquemática da sobreposição das zonas de reagentes e de amostra e formação do produto da reacção (parte inferior)	7
<b>Figura 1.2.</b> Representação esquemática de duas posições consecutivas da válvula selectora de fluidos	8
<b>Figura 1.3.</b> Diagrama esquemático ilustrativo da versatilidade dos sistemas SIA como ferramenta de manipulação e processamento das amostras	9
<b>Figura 1.4.</b> Representação esquemática do contributo da inversão do sentido de escoamento na dispersão da amostra no transportador	10
<b>Figura 1.5.</b> Representação esquemática da dispersão radial promovida no tubo enrolado em figuras de oito	11
<b>Figura 1.6.</b> Representação gráfica do grau de sobreposição de duas zonas adjacentes num sistema SIA	12
<b>Figura 1.7.</b> Esquema básico de uma montagem de um sistema de análise por injeção sequencial com enzimas imobilizadas.	19
<b>Figura 1.8.</b> Representação esquemática de um corte transversal do chip microfluídico, na qual pode ser observada a coluna enzimática imobilizada	26
<b>Figura 1.9.</b> Esquema representativo de uma célula de fluxo “jet ring cell”	31

### Capítulo 2 – Parte experimental

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática dos componentes de uma válvula selectora da Valco Instruments	61
<b>Figura 2.2.</b> Representação esquemática das posições da válvula de injeção do equipamento Crison utilizado no Capítulo 4	62
<b>Figura 2.3.</b> Válvula solenóide de 3 vias (A); Representação esquemática do seu interior (B)	63
<b>Figura 2.4.</b> Fotografia da unidade de extracção (A); Representação esquemática da vista de topo da cavidade da referida unidade (B)	64
<b>Figura 2.5.</b> Fotografia do reactor enzimático	65
<b>Figura 2.6.</b> Fotografia da câmara de agitação magnética	65
<b>Figura 2.7.</b> Fotografia da câmara de mistura	66

### Capítulo 3 – Determinação da glutathiona reduzida e da glutathiona oxidada em sangue total

<b>Figura 3.1.</b> Estruturas químicas da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG)	76
<b>Figura 3.2.</b> Esquema do módulo analítico desenvolvido para a quantificação da glutathiona reduzida e oxidada em amostras de sangue humano (A). Fotografia da montagem desenvolvida (B)	82
<b>Figura 3.3.</b> Curvas de calibração para a GSH e para a GSSG obtidas usando a metodologia convencional de comparação, expressas em GSH	84
<b>Figura 3.4.</b> Ensaio de regeneração DTNB-glutathiona reductase	86

<b>Figura 3.5.</b> Estudo de diferentes concentrações do par GR/NADPH: (♦) 0,4 U mL <sup>-1</sup> GR / 0,4 mmol L <sup>-1</sup> NADPH; (□) 5,0 U mL <sup>-1</sup> GR / 0,4 mmol L <sup>-1</sup> NADPH; (▲) 4,0 U mL <sup>-1</sup> GR / 0,8 mmol L <sup>-1</sup> NADPH e (○) 5,0 U mL <sup>-1</sup> GR / 0,8 mmol L <sup>-1</sup> NADPH . . . . .	88
<b>Figura 3.6.</b> Estudo da influência da concentração de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (□) e do pH (♦) da solução transportadora na sensibilidade do método . . . . .	90
<b>Figura 3.7.</b> Registo gráfico da penetração de zonas correspondentes aos reagentes envolvidos na reacção de amplificação . . . . .	91
<b>Figura 3.8.</b> Influência do volume de transferência, para o tubo de diluição, no factor de diluição obtido, usando 25 (♦) e 50 µL (□) de amostra. Factor de diluição: grau de diluição obtido pela razão entre os sinais obtidos com e sem diluição . . . . .	94
<b>Figura 3.9.</b> Registo obtido na análise do teor de GSSG em amostras de sangue humano. (A) branco e série de padrões com as concentrações em GSSG de 0,050 (P1); 0,125 (P2); 0,250 (P3); 0,750 (P4) e 1,500 (P5) µmol L <sup>-1</sup> ; (B) amostras de sangue humano . . . . .	96
 <b>Capítulo 4 – Determinação do teor de metanol em amostras de biodiesel com extracção líquido-líquido por membrana</b>	
<b>Figura 4.1.</b> Reacções químicas envolvidas na determinação colorimétrica do metanol pelo sistema bienzimático AOD/POD . . . . .	111
<b>Figura 4.2.</b> Esquema do módulo analítico desenvolvido para a determinação do metanol em amostras de biodiesel (A). Fotografia da montagem desenvolvida (B) . . . . .	115
<b>Figura 4.3.</b> Registos obtidos na análise do teor de metanol em amostras de biodiesel pelo método de cromatografia gasosa: A – Padrão com as concentrações em metanol e etanol de 0,025% (m/m); B – Amostra de biodiesel proveniente de girassol (50%) e mamona (50%) . . . . .	117
<b>Figura 4.4.</b> Imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento da morfologia da superfície das esferas de vidro alquilaminado: (a) AGB 200x, (b) AGB 30,000x . . . . .	120
<b>Figura 4.5.</b> Etapas do procedimento de imobilização envolvendo as esferas de vidro alquilaminado e o glutaraldeído . . . . .	120
<b>Figura 4.6.</b> Imagem obtida por microscopia electrónica de varrimento do filtro de membrana de PVFD, onde se podem observar os microporos da mesma . . . . .	123
<b>Figura 4.7.</b> Variação da sensibilidade do método com o volume de amostra (□) e o período de paragem do fluxo (♦). Condições: aspiração de 50 µL de solução aquosa aceitadora . . . . .	125
<b>Figura 4.8.</b> Curvas de calibração obtidas correspondentes aos intervalos até 0,015%□(m/m) (A) e 0,200%□(m/m) (B) de metanol . . . . .	126
<b>Figura 4.9.</b> Registo obtido na análise do teor de metanol em amostras de biodiesel. Série de padrões com as concentrações em metanol de 0,020; 0,050; 0,100 e 0,200% (m/m) . . . . .	126
 <b>Capítulo 5 – Avaliação do efeito dos anti-inflamatórios não-esteróides sobre a actividade da fosfolípase A<sub>2</sub> utilizando lipossomas</b>	
<b>Figura 5.1.</b> Representação esquemática do princípio do ensaio empregue para o estudo da actividade da PLA <sub>2</sub> e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs sobre a PLA <sub>2</sub> . . . . .	137
<b>Figura 5.2.</b> Representação esquemática da preparação de MLV e LUV pelo método de hidratação do filme lipídico . . . . .	139
<b>Figura 5.3.</b> Montagem de fluxo para o estudo da actividade da PLA <sub>2</sub> e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs e do ALA (A). Fotografia da montagem desenvolvida (B) . . . . .	140

<b>Figura 5.4.</b> Influência da concentração de PLA <sub>2</sub> no sinal analítico obtido (intensidade de fluorescência em %)	147
<b>Figura 5.5.</b> Avaliação da eficiência de inibição da PLA <sub>2</sub> (%) exibida pelo ALA de acordo com o tipo de incubação: dentro (○) e fora (●) do sistema	148
<b>Figura 5.6.</b> Avaliação da eficiência de inibição da PLA <sub>2</sub> (%) exibida pelos AINEs testados: tolmetina (◆); meloxicam (□) e ibuprofeno (▲)	148
<b>Figura 5.7.</b> Avaliação da eficiência de inibição exibida pelos fármacos testados pelo método discreto de comparação. Resultados obtidos da incubação dos AINEs com os lipossomas: ibuprofeno: 0 μmol L <sup>-1</sup> (○); 4 μmol L <sup>-1</sup> (□); 8 μmol L <sup>-1</sup> (▲); meloxicam: 0 μmol L <sup>-1</sup> (○); 6 μmol L <sup>-1</sup> (◆) e da incubação do ALA com PLA <sub>2</sub> : 0 μmol L <sup>-1</sup> (○); 4 μmol L <sup>-1</sup> (□)	150
 <b>Capítulo 6 – Avaliação da cinética da oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas contendo líquido iônico</b>	
<b>Figura 6.1.</b> Estrutura química do catião polialquilimidazólio dos líquidos iônicos orgânicos	160
<b>Figura 6.2.</b> Esquema do módulo analítico desenvolvido para a avaliação da cinética da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em meio de LI (A). Fotografia da montagem desenvolvida (B)	163
<b>Figura 6.3.</b> Registo obtido da oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI durante os ensaios. Os brancos são realizados na ausência da enzima. A concentração de substrato é igual a 0,053 mmol L <sup>-1</sup>	165
<b>Figura 6.4.</b> Oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase com formação da o-quinona correspondente	166
<b>Figura 6.5.</b> Espectro de ultravioleta-visível do ácido caféico (0,55 mmol L <sup>-1</sup> ) dissolvido na mistura [bmim][BF <sub>4</sub> ]/tampão 1:1 antes (linha tracejada) e após (linha contínua) a adição da tirosinase (200 U mL <sup>-1</sup> ). Todos os ensaios foram efectuados a 25°C usando uma cuvete termostatzada, com agitação magnética e com um percurso óptico de 1 cm. Os varrimentos foram efectuados no intervalo de comprimento de onda de 200-600nm. As setas ilustram o aumento ou a diminuição da absorvância	167
<b>Figura 6.6.</b> Velocidades de reacção (ΔUA s <sup>-1</sup> ) (n=3; RSD < 3,0%) obtidas com uma solução padrão de ácido caféico 0,311 mmol L <sup>-1</sup> para diferentes intervalos de tempo de propulsão da zona reaccional para o detector antes da aquisição do sinal	169
<b>Figura 6.7.</b> Velocidades de reacção (ΔUA s <sup>-1</sup> ) (n=3; RSD < 3,9%) obtidas com uma solução padrão de ácido caféico 0,053 mmol L <sup>-1</sup> utilizando diferentes concentrações de enzima	170
<b>Figura 6.8.</b> Velocidades de reacção (ΔUA s <sup>-1</sup> ) obtidas no intervalo de concentrações de ácido caféico 0,026 – 0,158 mmol L <sup>-1</sup> a pH igual a 5,5 (□); 6,0 (◆); 6,5 (▲); 7,0 (x) e 7,5 (○) unidades	171
<b>Figura 6.9.</b> Velocidades de reacção (ΔUA s <sup>-1</sup> ) obtidas no intervalo de concentrações de ácido caféico 0,026 – 0,158 mmol L <sup>-1</sup> à temperatura de 25 (◆); 30 (□); 40 (▲); 50 °C (x)	172
<b>Figura 6.10.</b> Gráficos de Michaelis-Menten em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico: LI:tampão 1:1 (■); LI:tampão 1,5:1 (▲); LI:tampão 2:1 (●) e metanol:tampão 1:1 (◆)	173
<b>Figura 6.11.</b> Monitorização da absorvância ao longo do tempo da reacção da tirosinase com os inibidores (0,263 mmol L <sup>-1</sup> ) testados (A – ácido <i>trans</i> -cinâmico; B - ácido 3,4-dihidroxibenzóico) na ausência do ácido caféico	175
<b>Figura 6.12.</b> Avaliação da eficiência de inibição da tirosinase (%) apresentada pelo ácido <i>trans</i> -cinâmico (A) e pelo ácido 3,4-dihidroxibenzóico (B)	176

<b>Figura 6.13.</b> Influência da concentração dos inibidores na actividade da tirosinase: (■) ácido <i>trans</i> -cinâmico; (◇) ácido 3,4-dihidroxibenzóico . . . . .	177
--	-----

**Capítulo 7 – Avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase**

<b>Figura 7.1.</b> Representação esquemática do módulo analítico desenvolvido para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD (A). Fotografia da montagem desenvolvida (B) . . . . .	188
<b>Figura 7.2.</b> Estudo da influência do caudal durante a etapa de detecção (A) e do volume de amostra, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e POD injectado no reactor (B) no sinal analítico obtido (intensidade de QL). Condições experimentais: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mmol L <sup>-1</sup> , luminol 0,1 mmol L <sup>-1</sup> e POD 10 U mL <sup>-1</sup> . . . . .	193
<b>Figura 7.3.</b> Estudo da influência do tempo de paragem de fluxo no reactor no sinal analítico obtido. Condições experimentais: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1,0 mmol L <sup>-1</sup> , luminol 0,1 mmol L <sup>-1</sup> , POD 10 U mL <sup>-1</sup> e fenol 1 mg L <sup>-1</sup> . . . . .	194
<b>Figura 7.4.</b> Estudo da influência da concentração dos reagentes na diferença da intensidade de QL: (A) luminol; (B) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e (C) POD . . . . .	195
<b>Figura 7.5.</b> Avaliação do efeito de potenciação do fenol e dos clorofenóis sobre o sistema luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD . . . . .	197
<b>Figura 7.6.</b> Avaliação do efeito de inibição dos nitrofenóis, dimetilfenóis e polifenóis sobre o sistema luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD . . . . .	198
<b>Figura 7.7.</b> Registo dos sinais analíticos obtidos para a solução de branco e soluções padrão de ácido tânico (A) e fenol (B) e respectivas concentrações . . . . .	204

## Índice de tabelas

### **Capítulo 1 – Introdução**

<b>Tabela 1.1.</b> Selecção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas imobilizadas em sistemas SIA . . . . .	21
<b>Tabela 1.2.</b> Selecção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas livres em solução (sistemas mono-, bi- e multienzimáticos) em sistemas SIA . . . . .	34

### **Capítulo 3 – Determinação da glutathione reduzida e da glutathione oxidada em sangue total**

<b>Tabela 3.1.</b> Comparação de diferentes metodologias de determinação da glutathione em amostras biológicas . . . . .	78
<b>Tabela 3.2.</b> Protocolo analítico para a determinação da glutathione reduzida e glutathione oxidada em amostras de sangue . . . . .	85
<b>Tabela 3.3.</b> Intervalos de valores estudados na optimização dos diferentes parâmetros do sistema e os valores escolhidos para a sua operação . . . . .	87
<b>Tabela 3.4.</b> Estudo dos análogos de GSH como possíveis interferentes . . . . .	95
<b>Tabela 3.5.</b> Resultados obtidos pela metodologia SIA e pela metodologia de comparação para a determinação de glutathione total e glutathione oxidada em amostras de sangue total . . . . .	97

### **Capítulo 4 – Determinação do teor de metanol em amostras de biodiesel com extracção líquido-líquido por membrana**

<b>Tabela 4.1.</b> Protocolo analítico para a determinação do metanol em amostras de biodiesel . . . . .	118
<b>Tabela 4.2.</b> Resultados obtidos pela metodologia SIA e pela metodologia de referência para a determinação de metanol em amostras de biodiesel . . . . .	127

### **Capítulo 5 – Avaliação do efeito dos anti-inflamatórios não-esteróides sobre a actividade da fosfolípase A<sub>2</sub> utilizando lipossomas**

<b>Tabela 5.1.</b> Procedimento analítico para o estudo da actividade da PLA <sub>2</sub> e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs e do ALA usando a metodologia SIA . . . . .	143
<b>Tabela 5.2.</b> Intervalos de valores usados para o estudo dos diferentes parâmetros do sistema e valores seleccionados para a sua operação . . . . .	146

### **Capítulo 6 – Avaliação da cinética da oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas contendo líquido iónico**

<b>Tabela 6.1.</b> Protocolo analítico para o estudo da cinética de oxidação do ácido caféico pela tirosinase e sua inibição em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico . . . . .	164
<b>Tabela 6.2.</b> Intervalos de valores estudados na optimização dos diferentes parâmetros do sistema e os valores escolhidos para a sua operação . . . . .	168
<b>Tabela 6.3.</b> Constantes cinéticas obtidas na oxidação biocatalítica do ácido caféico pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico . . . . .	172

**Capítulo 7 – Avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase**

<b>Tabela 7.1.</b> Procedimento analítico efectuado na montagem SIA-MSFIA para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD . . . . .	191
<b>Tabela 7.2.</b> Avaliação do comportamento de diversos compostos fenólicos no sistema de QL luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -POD . . . . .	199
<b>Tabela 7.3.</b> Métodos automáticos para a determinação do teor de polifenóis totais/capacidade antioxidante em vinhos . . . . .	201
<b>Tabela 7.4.</b> Resultados obtidos pela metodologia de fluxo e pela metodologia de referência para a determinação de ácido tânico em vinhos e grainhas de uva . . . . .	202
<b>Tabela 7.5.</b> Resultados obtidos pela metodologia de fluxo e pela metodologia de referência para a determinação de fenol em amostras de água fortificadas . . . . .	203
<b>Tabela 7.6.</b> Métodos automáticos para a determinação do teor de fenol em águas . . . . .	206

## Lista de abreviaturas

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
<b>AGB</b>	Esferas de vidro alquilaminado
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não esteróides
<b>ALA</b>	Ácido $\alpha$ -lipóico
<b>AMG</b>	Amiloglucosidase
<b>ANS</b>	Ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfónico
<b>AOD</b>	Álcool oxidase
<b>[bmim][BF<sub>4</sub>]</b>	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio
<b>BP</b>	Bomba peristáltica
<b>CC<math>\alpha</math></b>	Limite de decisão
<b>CC<math>\beta</math></b>	Capacidade de detecção
<b>CM</b>	Câmara de mistura
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DR</b>	Desvio relativo
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico)
<b>EDTA</b>	Sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético
<b>EPC</b>	Fosfatidilcolina da gema de ovo
<b>FC</b>	Folin-Ciocalteu
<b>FIA</b>	Análise por injeção em fluxo
<b>FTIR</b>	Espectrofotometria de absorção no Infravermelho com transformada de Fourier
<b>GOD</b>	Glucose oxidase
<b>GR</b>	Glutathione redutase
<b>GSH</b>	Glutathione reduzida
<b>GSSG</b>	Glutathione oxidada
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IF</b>	Intensidade de fluorescência
<b>K<sub>M</sub><sup>ap</sup></b>	Constante de Michaelis-Menten aparente
<b>LI</b>	Líquido iónico
<b>M2VP</b>	Trifluorometilsulfonato de 1-metil-2-vinilpiridínio

<b>MEKC</b>	Cromatografia micelar electrocinética
<b>MSFIA</b>	Análise por injeção em fluxo baseada em multisseringa
<b>m/m</b>	Relação massa por massa
<b>m/v</b>	Relação massa por volume
<b>NAD<sup>+</sup></b>	β-nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
<b>NADH</b>	β-nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)
<b>NADP<sup>+</sup></b>	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)
<b>NADPH</b>	β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reduzida)
<b>NEM</b>	<i>N</i> -etilmaleiimida
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolípase A <sub>2</sub>
<b>POD</b>	Peroxidase
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>PVC</b>	Cloreto de polivinilo
<b>PVDF</b>	Fluoreto de poliviniletileno
<b>QL</b>	Quimiluminescência
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo
<b>SIA</b>	Análise por injeção sequencial
<b>S<sub>y/x</sub></b>	Estimativa do desvio padrão da distribuição normal dos pontos da curva de calibração usada, segundo o método dos mínimos quadrados
<b>TA</b>	Tubo de armazenamento
<b>TD</b>	Tubo de diluição
<b>TNB</b>	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano
<b>U.A.</b>	Unidades de absorvância
<b>UE</b>	Unidade de extracção
<b>V<sub>max</sub><sup>ap</sup></b>	Velocidade de reacção máxima aparente
<b>VS</b>	Válvula selectora de fluidos
<b>2-VP</b>	2-vinilpiridina



# CAPÍTULO 1

---

Introdução



## 1.1. Métodos automáticos de análise

Nos últimos anos, como resultado da expansão da capacidade, desempenho e versatilidade da instrumentação disponível e do progresso tecnológico a nível da electrónica e computação, tem vindo a acentuar-se o recurso a procedimentos analíticos automáticos para o controlo de qualidade de produtos finais e intermédios.

Campos de aplicação tão diversos, desde a análise farmacêutica e alimentar, estendendo-se aos de índole clínico e ambiental, têm assistido ao emergir das técnicas de fluxo como ferramentas para automatização dos diferentes procedimentos analíticos.

O crescimento deste novo grupo de técnicas tem permitido intervir ao nível de um conjunto de factores que limitam o desempenho dos procedimentos analíticos convencionais, resultando em estratégias analíticas que possibilitam a análise de um elevado número de amostras, a minimização dos volumes de amostra e reagentes, a redução de exposição do operador face a amostras/reagentes perigosos, a eliminação de erros associados ao factor humano (dada a sua intervenção reduzida) com consequente aumento da precisão, de elevada eficiência analítica. Não obstante pois à importância dos métodos discretos, e sobretudo dos métodos robotizados, na implementação e automatização de procedimentos laboratoriais, os métodos de fluxo, especialmente os de fluxo contínuo não segmentado, têm ganho especial relevo na automatização de metodologias analíticas nas mais diversas áreas. Este tipo de estratégia de gestão de fluidos caracteriza-se por um escoamento contínuo, no espaço e no tempo, das soluções, baseando-se na introdução de uma alíquota de amostra, no interior de tubagem de dimensões reduzidas, e transporte da mesma segundo um percurso predefinido até ao detector. Durante este percurso, a amostra pode estar ou não sujeita a uma ou mais reacções químicas ou operações unitárias. A zona reaccional formada origina no sistema de detecção um sinal analítico, cuja intensidade é correlacionada com uma propriedade física ou química da solução analisada. Estas técnicas caracterizam-se assim por uma elevada reprodutibilidade nos processos de amostragem e de detecção, favorecida pela configuração fechada dos sistemas de fluxo, não sendo normalmente necessário atingir condições de equilíbrio físico ou químico, sendo a detecção baseada na aquisição de sinais transientes, o que resulta numa redução considerável do tempo de análise. A principal vantagem exibida por estas técnicas prende-se, fundamentalmente, com menores custos de instalação e operação e com uma flexibilidade acrescida, dada a sua estrutura modular, a qual permite, com o mesmo equipamento base, idealizar um número considerável de montagens, com fácil readaptação às necessidades inerentes a cada situação analítica a implementar.

A primeira técnica de fluxo contínuo não segmentado, a análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) [1] surge em 1975 e assenta no conceito de dispersão controlada no tempo e espaço e presume que qualquer amostra/solução injectada sofre exactamente a mesma dispersão no sistema de fluxo. O movimento da amostra gera um gradiente de concentrações, por reacção química ou por dispersão física, que se traduz num sinal transiente cuja forma e intensidade são condicionados, sob o ponto de vista meramente físico, pela distância e o tipo de percurso entre o ponto de inserção da amostra e o detector. A estratégia FIA traduzia-se numa maior rapidez de análise, com baixos custos de instalação e operação, bem como robustez na implementação dos sistemas analíticos, pois dispensava os dispositivos para a remoção das bolhas de ar previstos na técnica de fluxo segmentada [2]. Os conceitos em que o FIA se baseia tornaram-se assim na base comum das diferentes estratégias de fluxo que posteriormente foram desenvolvidas. As principais desvantagens desta técnica residem no consumo elevado de amostra e reagentes, devido ao seu escoamento contínuo, no carácter monoparamétrico das montagens e na necessidade de reconfiguração física sempre que é alterado o procedimento analítico.

Nos anos 90, surge a análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) [3], tornando possível a automatização de procedimentos mais complexos, que podem envolver um maior número de reagentes, fazendo uso dos avanços na área da computação na definição do volume de amostra inserido, nas suas condições de transporte e na aquisição do sinal transiente.

Actualmente, destaca-se o aparecimento de diferentes estratégias de controlo de fluidos, abrindo múltiplas perspectivas no momento de desenvolver e implementar uma metodologia analítica, como os sistemas baseados na multicomutação [4], na multisseringa [5], a lab-on-valve [6], os sistemas multibomba [7] e os sistemas de fluxo de interface única (SIFA, do inglês “Single Interface Flow Analysis”) [8].

Os sistemas baseados na multicomutação e na multisseringa baseiam-se na utilização de válvulas solenóides para a criação de redes de fluxo. Os primeiros integram válvulas solenóides, que podem ser dispostas em configurações distintas e actuar individualmente ou de forma combinada, permitindo a formação de uma rede de fluxo com uma elevada versatilidade em termos de manipulação da zona de amostra. Os segundos caracterizam-se pela utilização de um módulo de quatro seringas como dispositivo de propulsão, as quais se encontram ligadas em bloco a um único motor (operação multicanal) e possuem um êmbolo responsável pelo seu enchimento e esvaziamento. À saída de cada seringa existe acoplada uma válvula solenóide de três vias com a função de ligar a seringa ao sistema de fluxo ou ao reservatório da solução

que retém, de forma a aumentar a flexibilidade do sistema e permitir a economia de reagentes.

Os módulos de análise lab-on-valve correspondem a uma versão miniaturizada da metodologia SIA apresentando, portanto, os mesmos princípios de funcionamento. A miniaturização é conseguida através da concepção de uma estrutura compacta e robusta designada por unidade central de processamento da amostra, que se adapta à cabeça rotativa de uma válvula selectora de fluidos, usada na técnica SIA, e integra os seus canais de processamento com uma célula de fluxo que permite o acoplamento de vários sistemas de detecção.

Mais recentemente, foram propostos os sistemas multimbomba e os sistemas SIFA. O funcionamento dos primeiros assenta na utilização de microbombas solenóides unidireccionais, que permitem a impulsão individual da amostra e reagentes, responsáveis pela criação de um fluxo pulsado. Os segundos divergem do conceito tradicional de análise em fluxo contínuo pelo facto de não implicar a inserção de volumes definidos de amostra e reagente no percurso analítico mas por se basearem na penetração mútua de zonas de amostra e reagente numa interface única de reacção. Os dispositivos de inserção e propulsão das soluções podem ser buretas automáticas ou as microbombas solenóides e ainda válvulas solenóides para direccionamento do fluxo.

### 1.1.1. Análise por injeção sequencial

A análise por injeção sequencial (SIA) é considerada a segunda geração de sistemas de análise por injeção em fluxo. Foi concebida em 1990 por Ruzicka e Marshall [3] no sentido de simplificar mecanicamente os sistemas FIA, facilitando a implementação dos métodos de fluxo na monitorização em linha de processos industriais, onde a robustez, a estabilidade a longo prazo, a rotina de manutenção espaçada, a calibração automática e a automatização são requisitos essenciais [9]. De facto, esta técnica constitui uma ferramenta para incrementar a versatilidade dos sistemas analíticos, tornando possível a sua adaptação a diferentes amostras, bem como reacções químicas, de acordo com o carácter multi-paramétrico a ela associado. Hoje em dia, a análise por injeção sequencial é largamente aplicada na determinação de inúmeras espécies num leque abrangente de matrizes [10].

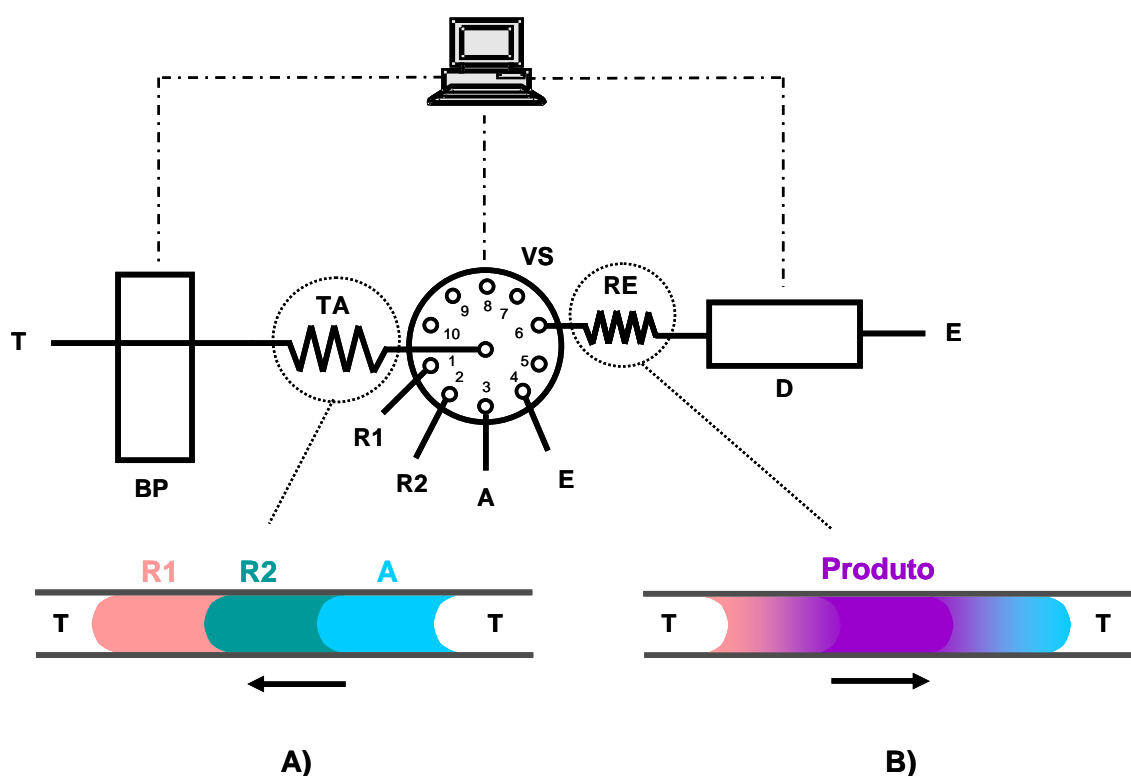
#### 1.1.1.1. Fundamentos e características

Os princípios de injeção da amostra, dispersão controlada e elevada precisão dos tempos de reacção são comuns ao FIA e ao SIA [9].

A análise por injeção sequencial é um método de fluxo não segmentado baseado no princípio do controlo da dispersão e manipulação reprodutível da amostra. Este método assenta no conceito de fluxo programado e envolve a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagente, através da conjugação de períodos de paragem e mudanças de sentido do escoamento. Durante uma análise, volumes precisos pré-determinados de reagentes e amostra são aspirados sequencialmente para o tubo de armazenamento (TA, Figura 1.1; “holding coil”, em inglês). Após a inversão do sentido do escoamento, a zona composta resultante da sobreposição das zonas de amostra e reagentes é transportada em direcção ao detector através de tubo de reacção (RE, Figura 1.1; “reaction coil”, em inglês) (Figura 1.1. – parte inferior), onde a sobreposição das zonas ocorre por uma combinação de efeitos dos processos de transporte conveccional e de difusão molecular [9, 11].

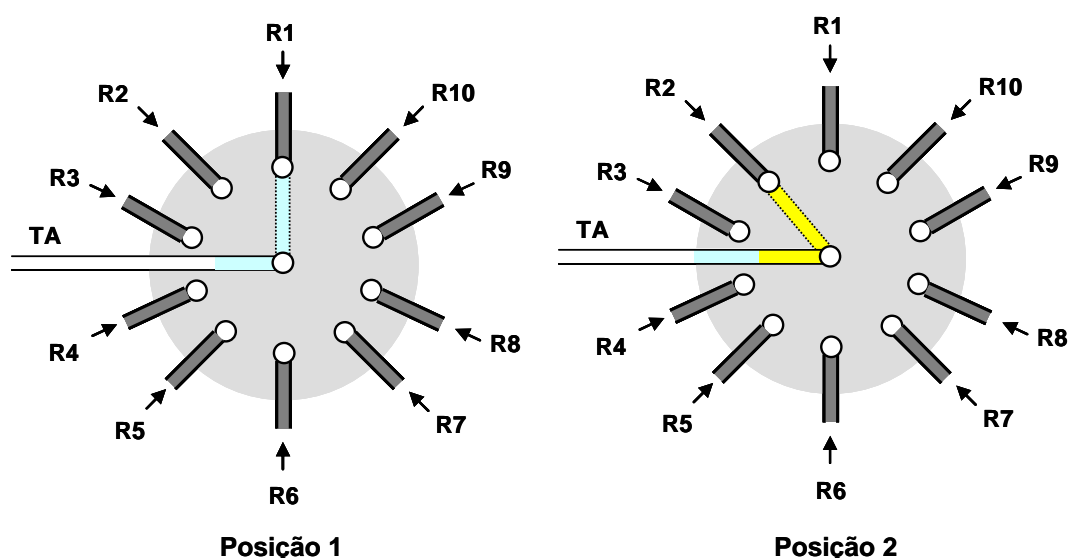
### 1.1.1.2. Componentes

A instrumentação em um sistema SIA (Figura 1.1.) pode ser dividida em três componentes principais: dispositivo propulsor, válvula selectora de fluidos e dispositivo de detecção, ligados entre si por uma única linha de transmissão formada por tubos de diâmetro interno reduzido e comandados por microcomputador.



**Figura 1.1.** (Parte superior) Esquema básico de uma montagem de um sistema de análise por injeção sequencial. **T** -Transportador; **BP** - Bomba peristáltica bidireccional; **TA** - Tubo de armazenamento; **VS** -Válvula selectora de multiposição; **A** - Amostra; **R1 e R2** - Reagentes; **E** - Esgoto; **RE** - Reactor; **D** - Detector. (Parte inferior) Representação esquemática da sobreposição das zonas de reagentes e de amostra e formação do produto da reacção: A) Aspiração sequencial dos reagentes e da amostra; B) Inversão do sentido de fluxo e propulsão do produto de reacção em direcção ao detector.

A válvula selectora de fluidos (VS, Figura 1.1), considerada o coração do sistema SIA, é o componente principal, contendo de seis a dez portas, além de uma porta central, que tem acesso a cada uma das outras por comutação da válvula (Figura 1.2.). As portas laterais permitem o acesso aos reagentes necessários para a aplicação do método analítico, à amostra e ao detector e também possibilitam procedimentos de manipulação da amostra. O dispositivo de propulsão, em geral uma bomba peristáltica ou uma seringa, ligado pelo TA à porta central da válvula selectora, assegura a condução bidireccional dos fluidos através da mesma.



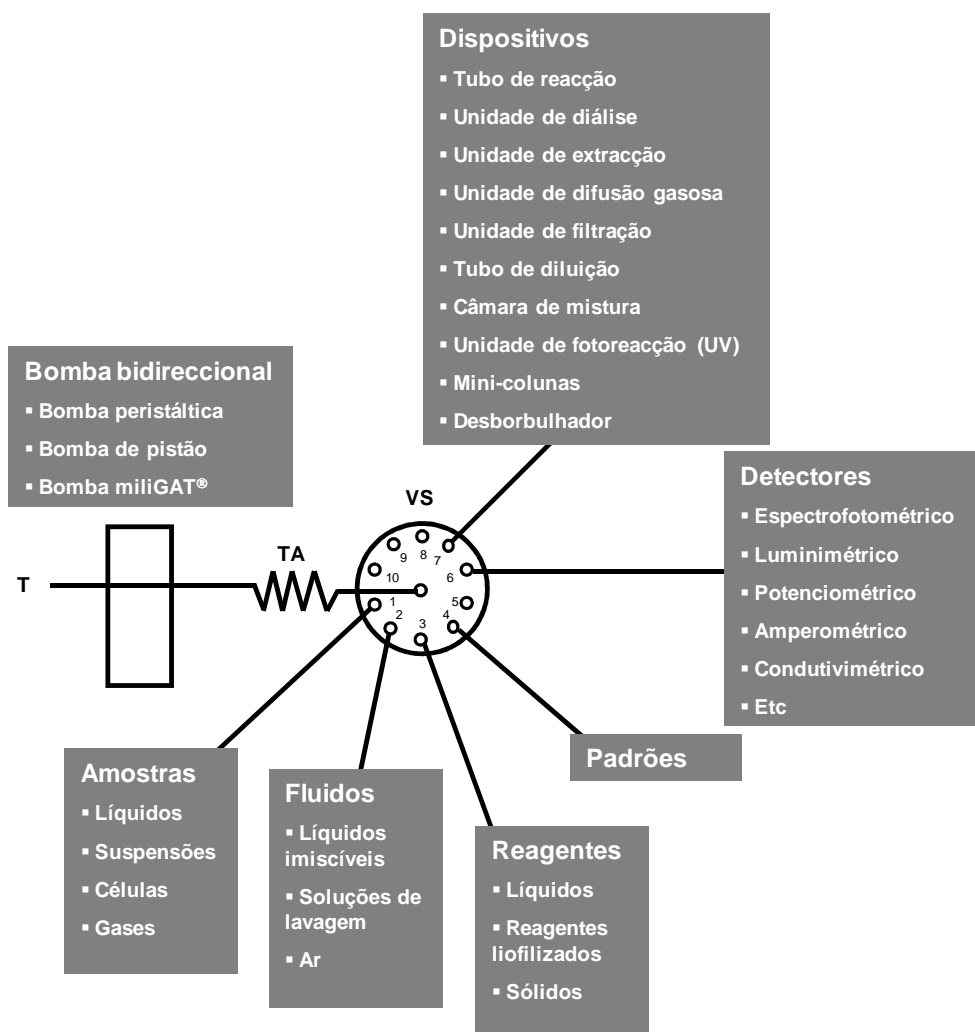
**Figura 1.2.** Representação esquemática de duas posições consecutivas da válvula selectora de fluidos.

Uma das características básicas dos sistemas SIA é o facto de apresentarem um computador, componente responsável pelo controlo sincronizado do dispositivo de propulsão e da válvula selectora de fluidos. Por controlo informático, é assim possível seleccionar a conexão da porta central da válvula com as portas laterais e dar instruções ao dispositivo de propulsão de modo a definir o caudal, o volume e a direcção de escoamento das diferentes soluções. Ao mesmo tempo permite efectuar a aquisição e o respectivo tratamento dos dados. Desta forma, dado o modo flexível e eficaz de definir as diferentes variáveis hidrodinâmicas, por simples alteração no teclado do microcomputador, possibilita a extensão da aplicação do sistema a variadas condições de medida ou determinações sem necessidade de reconfiguração física do próprio sistema.

A análise por injeção sequencial é uma técnica de gestão de fluidos versátil que permite efectuar procedimentos complexos de manipulação em linha e de pré-tratamento de amostras antes da etapa de detecção [12], tais como a diluição de amostras ou de



padrões, a separação por diálise ou por difusão gasosa, a extracção líquido-líquido e gás-líquido, a extracção em fase sólida, entre outros. Para este efeito são acopladas às portas laterais da válvula selectora de fluidos de multiposição as unidades necessárias, tais como reservatórios, reactores, separadores, detectores, entre outros dispositivos (Figura 1.3.).



**Figura 1.3.** Diagrama esquemático ilustrativo da versatilidade dos sistemas SIA como ferramenta de manipulação e processamento das amostras. Modificado de [13].

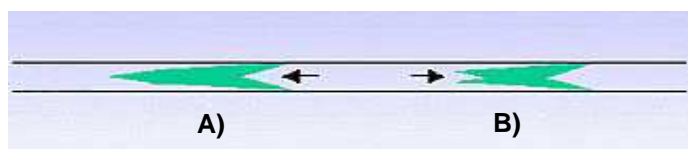
A principal limitação da SIA relativamente à metodologia FIA é o aumento do tempo requerido para a análise de uma determinada amostra devido, não só, ao tempo de reacção e de medida, como também, ao tempo dispendido na aspiração sequencial das diferentes soluções e na comutação entre as diferentes portas laterais da válvula selectora. Estes factores acarretam a reduções significativas dos ritmos de amostragem o que poderá ser prejudicial quando se pretende medidas analíticas em larga escala.

### 1.1.1.3. Dispersão e sobreposição de zonas

O controlo da dispersão de modo a promover uma maior ou menor mistura de reagentes é essencial para o estabelecimento de uma montagem SIA.

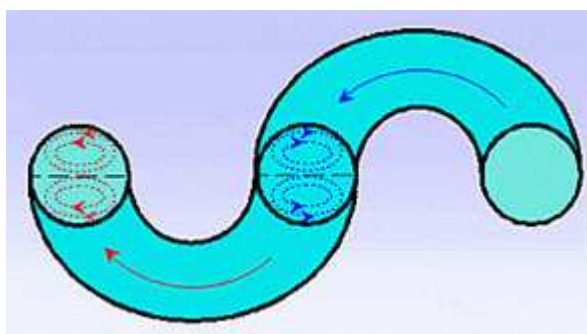
Para a dispersão dos segmentos de amostra e reagentes contribuem dois processos: o transporte por convecção, condicionado pelas dimensões da tubagem, e o transporte por difusão. O transporte por convecção predomina no início do transporte, no qual as partículas inseridas num escoamento laminar estão sujeitas ao longo do diâmetro do tubo a um perfil parabólico de velocidades, em que as partículas junto à parede do tubo têm uma velocidade linear nula enquanto que as que se movem no centro têm o dobro da velocidade média. O transporte por difusão acontece segundo os gradientes de concentração gerados nos diversos instantes do transporte por convecção, sendo que pode ser axial ou radial. A difusão axial ocorre na direcção do fluxo e é responsável por uma diluição acentuada do segmento de zona composta e pelo próprio alargamento dos picos. A difusão radial provoca o movimento das partículas adjacentes às paredes do tubo para o seu centro e vice-versa, perpendicularmente à direcção do fluxo, o que retarda a diluição da zona composta (preservando assim a sua identidade), traduzindo-se num aumento de sensibilidade, e dá origem a picos mais estreitos.

Num sistema SIA com a inversão do sentido de escoamento a dispersão axial dos segmentos de amostra e reagentes é minorada, o que contribui para um perfil de concentrações relativamente simétrico que implica que, na passagem pelo detector, seja registada uma distribuição de concentrações com a forma de um pico aproximadamente gaussiano. Esta inversão do sentido de fluxo exerce um papel preponderante na mistura das soluções num sistema SIA. A Figura 1.4. representa graficamente o que acontece no momento de aspiração da amostra (A) e nos segundos após o início do escoamento do transportador em direcção ao detector durante a inversão de fluxo (B).



**Figura 1.4.** Representação esquemática do contributo da inversão do sentido de escoamento na dispersão da amostra no transportador. Adaptado de [14].

Mudanças frequentes e acentuadas no percurso das soluções, conseguidas usando tubagem com uma configuração em figuras de oito (serpentina), promovem e intensificam a dispersão radial das soluções ao longo do seu percurso, como ilustrado na Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Representação esquemática da dispersão radial promovida no tubo enrolado em figuras de oito. Note-se que com a inversão do sentido de escoamento, as linhas de corrente radial também invertem em direcção. Adaptado de [14].

A dispersão da amostra no fluido transportador vai depender, não só, do próprio percurso no módulo analítico, dos volumes intrínsecos do próprio módulo, bem como de outros dispositivos que alterem as condições de fluxo mas também, dos volumes e características físico-químicas das soluções envolvidas (ex. viscosidade).

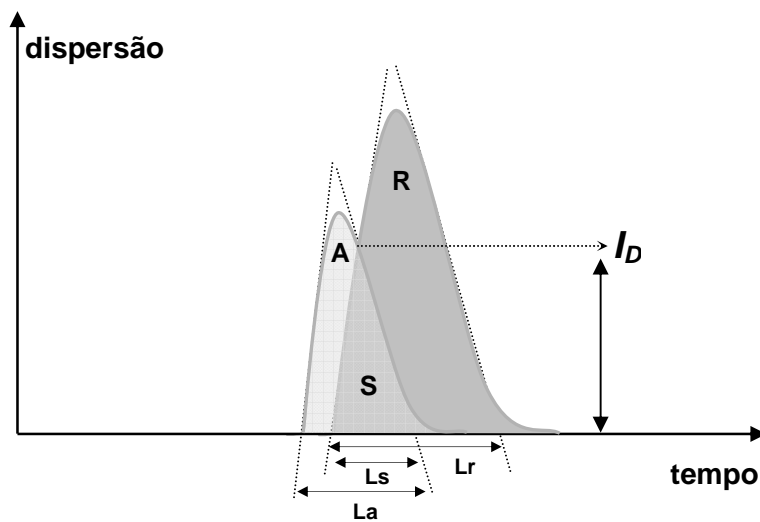
A extensão com que a reacção procede vai depender, além do tempo de residência no sistema, do grau de sobreposição das zonas adjacentes de reagente e amostra, o qual está intimamente relacionado com a dispersão mútua sofrida pelas zonas de amostra e reagente [9]. Neste sentido, foram definidos parâmetros que auxiliam a compreensão da dispersão das zonas. Estes incluem: o coeficiente de dispersão ( $D$ ) [1]; o  $S_{1/2}$ , que corresponde ao volume injectado necessário para se atingir um  $D$  igual a 2 unidades [9, 15] e o grau de sobreposição de zonas ( $S$ ).

Fixando-se as dimensões e a geometria do reactor, o grau de sobreposição de duas zonas adjacentes num sistema SIA pode ser avaliado por aspiração alternada de uma solução corada em substituição do reagente e da amostra, registando-se o sinal correspondente dos gradientes de concentração e sobrepondo-os no mesmo gráfico, como mostrado na Figura 1.6.

O grau de sobreposição (S) é definido pela expressão:

$$S = \frac{2L_s}{(L_a + L_r)}$$

onde  $L_a$  e  $L_r$  são as larguras de pico na linha de base da amostra e reagente, respectivamente, enquanto  $L_s$  é a largura da base da região de sobreposição das zonas. Quando  $S = 1$  ocorre sobreposição total das zonas, porém quando  $S = 0$  não existe sobreposição. Na ausência de sobreposição completa, como habitualmente acontece, observa-se um ponto de isodispersão ( $I_D$ , Figura 1.6.) no qual os coeficientes de dispersão da amostra e do reagente são idênticos, de modo que a razão das concentrações é igual à das soluções puras antes de serem injectadas no sistema. O estudo de sobreposição de zonas é essencial para garantir a implementação efectiva e rentabilização máxima de uma montagem SIA [9], pois permite assim definir um parâmetro que descreve o grau de penetração de zonas, de modo a estabelecer o intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa baseada em altura ou área de pico.



**Figura 1.6.** Representação gráfica do grau de sobreposição de duas zonas adjacentes num sistema SIA.

O grau de sobreposição depende das dimensões dos tubos usados, do caudal, da ordem de aspiração e da relação dos volumes das soluções aspiradas [16, 17].

Uma das limitações da técnica SIA prende-se com o número de zonas que podem ser misturadas por inversão de fluxo, num reactor tubular, já que os segmentos de amostra e reagentes são colocados “topo a topo” e, portanto, é mais difícil a sobreposição das zonas de amostra e reagentes adjacentes.

## 1.2. Associação dos ensaios enzimáticos à análise por injeção sequencial

As enzimas são catalisadores biológicos de natureza proteica responsáveis por incrementar a velocidade da maioria das reacções químicas que mantêm a homeostase animal. Em virtude do elevado grau de regioselectividade e estereoespecificidade com que exercem a catálise, as enzimas vêm sendo muito utilizadas em diversas áreas como química analítica, medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos ambientais [18].

O recurso a metodologias enzimáticas como base de análise, em variadas matrizes, possibilita a obtenção de procedimentos analíticos expeditos e torna as determinações menos sujeitas a interferências de outros elementos que não o analito. Adicionalmente, a utilização de enzimas com fins analíticos evita o recurso a produtos químicos tóxicos e vai assim ao encontro das preocupações da química analítica moderna, ao conceito de Química Verde, permitindo reduzir o volume de efluentes nocivos. Efectivamente, as enzimas são produtos naturais biodegradáveis com reduzido impacto ambiental.

Paralelamente à implementação de procedimentos enzimáticos, sobretudo nos campos clínico e bioquímico, é importante o desenvolvimento de técnicas e instrumentação que permitam a determinação de vários analitos de forma rápida e exacta [19]. Como requisitos adicionais, temos a automatização com uma intervenção mínima do operador e os baixos custos de operação e manutenção [20].

A automatização dos ensaios enzimáticos [19] contempla a preparação da mistura reaccional bem como a determinação da actividade enzimática ou de um dos reagentes envolvidos. Neste contexto, a análise por injeção sequencial parece constituir uma ferramenta ideal para a automatização de métodos baseados em reacções enzimáticas.

Esta metodologia permite um controlo rigoroso e reprodutível das condições reaccionais em termos de tempo e espaço, o que permite a fácil implementação de determinações cinéticas, nas quais é necessário um controlo preciso do tempo de paragem do fluxo. Os métodos enzimáticos de análise possuem na sua essência um carácter cinético. A cinética de uma conversão biocatalítica é uma função das concentrações dos reagentes, do tempo, das condições reaccionais, entre outros factores. Deste modo, para a determinação exacta da concentração de substrato ou da actividade enzimática, todos estes parâmetros devem estar estritamente controlados e neste contexto a análise por injeção sequencial ganha especial relevo. O tempo de reacção e as condições de transporte são claramente definidos através da configuração da montagem SIA (caudal, volume, tamanho do tubo de reacção, etc.) e como tal é garantida reprodutibilidade em todas as operações, o que se traduz em iguais condições

ao longo das determinações. Além disso, as próprias condições químicas da reacção (tais como o pH, força iónica, etc.) podem ser facilmente determinadas pela composição da solução transportadora usada.

Adicionalmente, a associação do SIA a procedimentos enzimáticos, possibilita uma redução do volume de enzima(s), substrato(s) e outros reagentes, comparativamente aos métodos convencionais. No caso da imobilização das enzimas a um suporte, pode permitir uma reutilização contínua e a utilização de concentrações mais elevadas e, conseqüentemente, poder conduzir a um aumento do rendimento da reacção. Por outro lado abre possibilidades no sentido de efectuar determinações sequenciais de vários substratos uma vez que as diferentes enzimas podem ser colocadas em pontos distintos do sistema de fluxo.

Por outro lado, a versatilidade da técnica SIA enquanto ferramenta de pré-tratamento de amostras torna esta metodologia apropriada para aplicações de índole clínico, biomédico, alimentar e ambiental, nas quais procedimentos prévios de manipulação das amostras são frequentemente necessários antes da determinação propriamente dita. Assim, a metodologia SIA permite não só a automatização da etapa correspondente à da reacção enzimática, bem como de todas as outras constituintes do procedimento analítico. Adicionalmente, como cada etapa pode ser otimizada independentemente, estes sistemas vão proporcionar condições óptimas nas etapas de amostragem, da remoção/"dissimulação" de interferentes, da conversão enzimática e finalmente da detecção.

Pode-se afirmar que a combinação das potencialidades da análise por injeção sequencial com o emprego das enzimas tem sido utilizada transversalmente, em imensas aplicações, como se pode constatar pelo número de publicações em revistas científicas. A implementação de procedimentos analíticos enzimáticos, em sistemas SIA, tem contribuído para simplificar e potencializar os processos analíticos e, igualmente, proporcionar soluções alternativas mais eficientes e rápidas a metodologias existentes, realizadas de um modo discreto ou, mesmo, com algum grau de automatização.

Neste sentido, é possível constatar os esforços que têm sido realizados nomeadamente ao nível da incorporação das enzimas em sistemas de fluxo, com o objectivo de criar condições operacionais óptimas para as mesmas, de reduzir o seu consumo, bem como de diminuir o tempo de resposta do sistema analítico. A utilização de enzimas em sistemas SIA tem assumido vários contornos e, de uma forma geral, nas metodologias desenvolvidas é possível encontrar as enzimas livres em solução, imobilizadas num suporte físico inerte, integradas em sensores ópticos ou electroquímicos [21]. A escolha da forma de utilização da enzima depende

essencialmente do fim a que o módulo analítico se destina e das características da própria enzima.

A extraordinária selectividade para substratos (incluindo quimio-, régio- e enantio-especificidade) tem sido explorada de forma cada vez mais intensa, sendo que a aplicação eficaz das enzimas na catálise de reacções encontra-se intimamente ligada à sua estabilidade operacional. Desta forma, torna-se imperativo a criação de um ambiente reaccional adequado para a manutenção da conformação estrutural da enzima cataliticamente activa. Para além do meio aquoso, considerado por excelência o habitat natural das enzimas, há a considerar os meios misto e orgânico como uma forma de ultrapassar limitações inerentes ao ambiente aquoso (estabilidade enzimática, pouca solubilidade de analitos com características hidrofóbicas, entre outras) e aproveitar as vantagens destes dois últimos meios (enzimas cataliticamente activas em meios hidrófobos naturais, mimetização e o paralelismo de ambientes biológicos, etc.). Por outro lado, existem factores do próprio meio reaccional que afectam a cinética das reacções enzimáticas, podendo aumentar ou diminuir a velocidade da reacção, pela modificação na estrutura dos locais activos das diferentes enzimas e, consequentemente, alterando a actividade catalítica. Os principais factores são o pH, a temperatura e a força iónica [22].

As enzimas apresentam um pH óptimo no qual possuem actividade máxima, o qual é determinado experimentalmente nas condições de trabalho. As curvas de variação de actividade enzimática em diferentes valores de pH reflectem o estado de ionização dos importantes grupos doadores ou aceitadores de protões no centro catalítico e seus respectivos estados de ionização adequados. A dependência da actividade enzimática com o pH tem a forma de uma curva em forma de sino, cujo máximo (que corresponde ao pH óptimo) varia de enzima para enzima [23]. A velocidade catalítica das enzimas pode assim ser regulada por variações do pH do meio em que se encontram.

No que respeita à temperatura, pode-se dizer que para cada enzima existe uma temperatura óptima para um determinado conjunto experimental. Geralmente, a velocidade de reacção aumenta à medida que se aumenta a temperatura. Este aumento induz um aumento da agitação molecular e da frequência de colisão entre as moléculas da enzima e do substrato. Para temperaturas elevadas, de uma forma geral, a desnaturação proteica por modificação da estrutura espacial da enzima toma lugar.

A força iónica afecta o equilíbrio do sistema influenciando na reacção enzimática. A actividade de um sistema enzimático depende não só do valor de pH, mas também do tipo de solução tampão utilizada, que pode afectar a actividade ou a estabilidade de uma enzima, devido a presença de cargas, termodinâmica da reacção, efeitos de complexação, entre outros factores [23]. Desta forma, deve-se eliminar a interferência de determinados iões e controlar a força iónica do meio reaccional.



Outros factores que influenciam a cinética das reacções enzimáticas são os cofactores e a presença de inibidores [22]. Os primeiros são substâncias necessárias à enzima para torná-la activa ou aumentar o seu poder catalítico. Os segundos são compostos que interagem com a própria enzima ou com o substrato. O efeito dos inibidores pode traduzir-se em inibições competitiva, não-competitiva e acompetitiva.

Uma vez que o trabalho desenvolvido teve por objectivo a implementação de metodologias enzimáticas em sistemas SIA em que se pretendeu explorar o potencial analítico da utilização das enzimas em diferentes situações analíticas, considerou-se de interesse efectuar uma avaliação da evolução dos casos analíticos reportados na literatura, considerando as estratégias empregues e as vantagens/desenvolvimentos a eles associados. Os casos descritos pretendem respeitar as designações e modelos originais relativamente às metodologias e estratégias desenvolvidas pelos autores.

As reacções catalisadas por enzimas têm sido utilizadas com diferentes finalidades como sendo a determinação da própria actividade enzimática, ou de um analito que esteja envolvido na reacção enzimática (substrato, cofactor, produto ou inibidor) [24]. Deste modo, para as situações analíticas a seguir expostas, as enzimas podem constituir ferramentas bioanalíticas como reagentes para a determinação dos seus substratos ou produtos ou funcionar como analitos (ensaios de actividade e inibição enzimática).

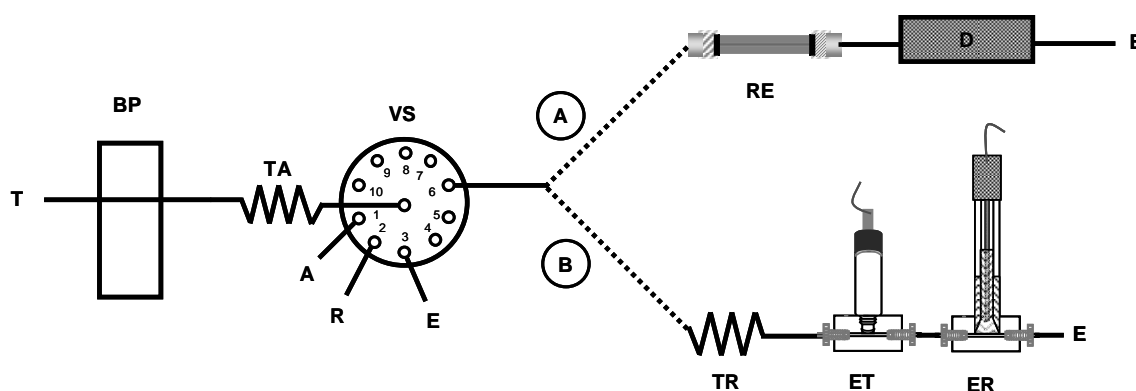
### 1.2.1. Emprego das enzimas como reagentes bioanalíticos

A utilização analítica das enzimas está predominantemente relacionada com a determinação dos respectivos substratos. Estas aplicações beneficiam com uma elevada actividade biocatalítica de forma a permitir a maior conversão possível do analito em questão num produto detectável. A actividade enzimática deve assim ser constante, para se assegurar que o produto de reacção resultante do decurso da reacção enzimática é dependente apenas da concentração do substrato e não de quaisquer outros factores.

As enzimas empregues na determinação de um analito que esteja envolvido na reacção enzimática, como sendo o substrato, cofactor, produto ou inibidor, podem ser utilizadas livres em solução ou imobilizadas. Ao contrário do que se sucede nas aplicações enzimáticas em sistemas FIA, encontram-se reportados quantidades assinaláveis de montagens SIA empregando as enzimas como ferramentas bioanalíticas quer em solução quer imobilizadas. Na realidade, os sistemas FIA explorando a utilização de enzimas em solução são raramente reportados na literatura, dado o consumo elevado de enzima e reagentes, devido ao escoamento contínuo das soluções, restringindo-se sobretudo a enzimas de baixo custo, de elevada disponibilidade e eficiência catalítica, como a glucose oxidase (GOD) [25] e como tal na maioria dos sistemas FIA as enzimas são aplicadas na forma imobilizada. Com a análise por injeção sequencial, o consumo de enzimas é minimizado, tendo em conta as características desta metodologia.

### 1.2.1.1. Utilização das enzimas imobilizadas

De forma similar ao observado nos sistemas FIA, existem duas formas de incorporação das enzimas imobilizadas num sistema SIA. A enzima pode ser utilizada como uma parte constituinte do sistema, mas separada dele, sob a forma de um reactor enzimático, ou pode ser integrada no próprio detector do sistema, como biosensor, funcionado assim como receptor do processo de reconhecimento biomolecular (Figura 1.7.).



**Figura 1.7.** Esquema básico de uma montagem de um sistema de análise por injeção sequencial com enzimas imobilizadas. **T** -Transportador; **BP** - Bomba peristáltica bidireccional; **TA** - Tubo de armazenamento; **VS** -Válvula selectora de multiposição; **A** - Amostra; **R** - Reagente; **E** - Esgoto. A zona composta resultante da sobreposição das zonas de amostra e reagente é transportada em direcção ao detector, seguindo o percurso: **A**) Reactores enzimáticos (**RE** – Reactor enzimático; **D** - Detector) ou o percurso **B**) Biosensores enzimáticos (**TR** - Tubo de reacção; **ET** - Eléctrodo de trabalho (eléctrodo enzimático); **ER** - Eléctrodo de referência). Os reactores enzimáticos podem não estar posicionados imediatamente antes do detector, como será descrito posteriormente.

A principal vantagem da imobilização enzimática é o facto de permitir uma reutilização contínua das enzimas. Como vantagens adicionais, temos o aumento da termoestabilidade em decorrência da interacção com o suporte bem como o aumento da estabilidade operacional. Por outro lado, devem, porém, ser tomadas em conta os seguintes aspectos negativos inerentes à própria imobilização: a susceptibilidade de estruturas activas da macromolécula aos reagentes utilizados e/ou às tensões conformacionais impostas pela união forçada a um material estranho (suporte), podendo traduzir-se numa possível perda (parcial ou mesmo total) da actividade da enzima; a

actividade catalítica pode diminuir devido à forte ligação existente entre o suporte e a enzima, podendo, por exemplo, limitar a capacidade do catalisador de assumir modificações estruturais adequadas, que favoreçam o encaixe perfeito do substrato no seu local activo; a inexistência de um método geral de imobilização e a dificuldade de se estabelecer as melhores condições de imobilização; o facto da união do suporte com a enzima ser aleatória e por último os suportes usados não serem recuperáveis com facilidade.

A Tabela 1.1. apresenta uma selecção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas imobilizadas, que ilustram diferentes estratégias de imobilização das enzimas para incorporação em sistemas SIA.

Tabela 1.1. Seleção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas imobilizadas em sistemas SIA

Analito(s)	Área de aplicação/Matriz	Agente(s) imobilizado(s)	Sistema de de detecção	Intervalo linear	Limite de detecção	Ritmo de determinação (h <sup>-1</sup> )	Ref.
Glucose e penicilina	Biotechnologia/Caldos de fermentação	Reactores tubulares de glucose oxidase e penicilinase	Espectrofotometria (Visível) e Quimiluminiscência	0,01 – 7,0 g L <sup>-1</sup> (glucose) 0,1 – 1,8 g L <sup>-1</sup> (penicilina)	-	15	[26]
Glucose e etanol	Biotechnologia/Caldos de fermentação da cerveja	Reactores empacotados de glucose oxidase e álcool oxidase	Electroquímica (amperometria)	5 – 750 mg L <sup>-1</sup> (glucose) 0,15 – 30 mg L <sup>-1</sup> (etanol)	-	50	[27]
Aspartame	Alimentar/Adoçantes comerciais	Reactores empacotados de $\alpha$ -quimotripsina e a álcool oxidase	Espectrofotometria (Visível)	25 – 350 mg L <sup>-1</sup>	2,16 mg L <sup>-1</sup>	15	[28]
Glicerol e etanol	Alimentar/Vinhos	Reactores empacotados de glicerol desidrogenase e álcool desidrogenase	Espectrofotometria (Ultravioleta)	0,03 – 0,30 g L <sup>-1</sup> (glicerol) 0,10 – 0,50 % (v/v) (etanol)	0,008 g L <sup>-1</sup> (glicerol) 0,005 % (v/v) (etanol)	22,5	[29]
Glucose	Alimentar/Leites	Reactor empacotado com a glucose oxidase e peroxidase co-imobilizadas	Espectrofotometria (Visível)	18 - 120 mg L <sup>-1</sup>	18 mg L <sup>-1</sup>	10	[30]
Glucose	Geral	Glucose oxidase imobilizada num canal de um microchip microfluidico	Quimiluminiscência	0,01 – 5,0 mmol L <sup>-1</sup>	10 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>	20	[31]
Hidratos de carbono (maltose)	Alimentar/Cervejas	Amiloglucosidase imobilizada na célula de fluxo	FTIR	0,86 – 7,13 g L <sup>-1</sup>	-	– (tempo de reacção de 10 minutos)	[32]
Etanol	Biotechnologia e alimentar/Caldos de fermentação de vinhos e vinhos	Biosensor (eléctrodo de grafite e eléctrodo impresso) de álcool desidrogenase	Electroquímica (amperometria)	1-1000 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>	1 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>	30	[33]
Lactato	Farmacêutica/Produtos farmacêuticos	Biosensor sol-gel (eléctrodo de platina) de lactato oxidase	Electroquímica (amperometria)	5x10 <sup>-5</sup> – 5x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	1 x10 <sup>-5</sup> mol L <sup>-1</sup>	40	[34]
Glucose	Alimentar/Sumos de fruta	Três biosensores de glucose oxidase	Electroquímica (voltametria)	Até 3,0 mmol L <sup>-1</sup>	-	-	[35]

#### 1.2.1.1.1. Sistemas SIA com reactores enzimáticos

Os sistemas SIA baseados em reactores enzimáticos resultam numa configuração versátil, uma vez que o(s) reactor(es) enzimático(s) pode(m) encontrar-se em diferentes posições. O reactor pode ser acoplado a uma das portas laterais da válvula selectora [26, 36-38] ou estar posicionado entre a válvula selectora e o detector [27, 30, 39-42] e nalguns casos imediatamente antes do tubo de reacção [28].

Ao contrário dos sistemas SIA baseados em biosensores, neste tipo de sistemas as condições operacionais para o reactor enzimático podem ser optimizadas separadamente. Isto torna-se especialmente importante quando existe mais de uma enzima envolvida na bioconversão do analito, pois, deste modo, cada reactor enzimático pode estar posicionado separadamente, em diferentes pontos do sistema, e operar em condições óptimas. Além disso, nestes sistemas, é possível colocar diferentes reactores enzimáticos em paralelo, permitindo assim a determinação simultânea de dois ou mais analitos com o mesmo detector. Os reactores podem, por exemplo, estar posicionados no seguimento um do outro permitindo a bioconversão de um substrato e de um produto resultante da primeira conversão enzimática [28, 41], tal como acontece no caso de co-imobilização de duas enzimas no mesmo reactor [30].

Estes sistemas apresentam uma aplicabilidade mais vasta, comparativamente aos biosensores. Os reactores enzimáticos podem ser utilizados em sistemas SIA com detecção espectrofotométrica, fluorimétrica, quimioluminimétrica, entre outras. Na realidade, existe apenas uma aplicação de reactores enzimáticos com sistema de detecção electroquímica [27], na qual a GOD e a álcool oxidase (AOD) são immobilizadas em esferas de vidro alquilaminado, para a monitorização simultânea em linha de glucose e de etanol em caldos de fermentação da cerveja através da monitorização amperométrica do peróxido de hidrogénio formado. Este tipo de estratégia parece oferecer vantagens em relação aos biosensores enzimáticos (descritos na secção seguinte), uma vez que obvia a necessidade de uma penetração no interior da camada biocatalítica e subsequente difusão das espécies electroactivas formadas para a superfície do transdutor [43].

A principal desvantagem apresentada por estes sistemas contendo reactores enzimáticos é a dispersão da zona da amostra, que ocorre nos reactores empacotados, onde a enzima é immobilizada num suporte, inerte, que preenche a coluna. Para minorar este aspecto, usam-se reactores enzimáticos com uma concentração elevada de enzima, o que possibilita uma conversão enzimática do analito rápida e eficiente.

No que concerne à técnica de imobilização nos reactores enzimáticos, que se baseia na ligação a um suporte, a enzima é retida num sólido mediante interações

estabelecidas entre matriz e enzima. A interacção mais usual é a ligação covalente entre os grupos dos resíduos de aminoácidos localizados na estrutura proteica da enzima (de preferência, em posições não estratégicas para a catálise) e os grupos reactivos existentes no suporte.

O método mais popular de imobilização covalente de enzimas resulta da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e o suporte insolúvel, com reagentes funcionais, como sendo o glutaraldeído [44]. Numa primeira fase, o suporte reage com o glutaraldeído, com activação dos seus grupos funcionais. Posteriormente, após remoção do excesso de activador, o suporte e a enzima são postos em contacto. Esta mistura é deixada sob condições moderadas de temperatura por um dado tempo, a fim de que as ligações covalentes entre o suporte e a enzima se estabeleçam. Deste modo, o glutaraldeído estabelece uma ponte de união entre a enzima e o suporte, com os quais forma ligações covalentes análogas.

O uso do glutaraldeído como agente activador do suporte utilizado no processo de imobilização dos reactores enzimáticos incorporados em sistemas SIA tem sido transversal à maioria das aplicações analíticas desenvolvidas. Em relação ao suporte utilizado, este varia desde esferas de sílica [39, 40, 45, 46], tubo de nylon [26, 36, 37], esferas de vidro alquilaminado [27-31, 41, 42], até nanopartículas magnéticas [47].

Shu et al. [39, 40] desenvolveram dois sistemas SIA com reactores enzimáticos empacotados para a determinação do D-ácido láctico. As enzimas empregues, D-Lactato desidrogenase e L-alanina aminotransferase foram co-imobilizadas em esferas de sílica modificadas com grupos aminopropiltrietoxisilano e a determinação era efectuada através da medição da absorvância do  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida, NADH) formado ( $\lambda=340$  nm) após paragem de fluxo no reactor enzimático, na presença de  $\text{NAD}^+$ . Na primeira aplicação [39], o D-ácido láctico foi determinado em carnes, ao passo que posteriormente este analito foi monitorizado ao longo do processo de fermentação de microorganismos de *Lactobacillus delbrueckii* [40]. Nesta última aplicação, o sistema de fluxo incluía adicionalmente uma unidade de filtração acoplada ao fermentador, seguida de uma unidade de diluição que permitia realizar a amostragem através da válvula selectora. O mesmo grupo de investigação desenvolveu mais tarde um método para a determinação de etanol em meios de fermentação de *Thermoanaerobium brockii* [45]. Esta determinação compreendia a utilização da álcool desidrogenase imobilizada em esferas de sílica colocadas num reactor enzimático, incorporado num sistema SIA semelhante ao referido anteriormente e com o mesmo sistema de detecção.

Davidsson et al. [46] desenvolveram um sistema SIA microfluídico para a monitorização em tempo real da produção e libertação de glucose e etanol das leveduras.

Para o efeito, a GOD ou AOD foram co-imobilizadas com a peroxidase (POD) em esferas de sílica funcionalizadas num microchip do tipo “flow-through”. O peróxido de hidrogénio resultante da oxidação enzimática da glucose (no caso da GOD) ou do etanol (no caso da AOD) era posteriormente determinado por quimiluminescência (QL) na superfície do microchip através da oxidação do luminol pela POD potenciada pela presença do *p*-iodofenol.

Contrariamente aos reactores enzimáticos empacotados, os reactores tubulares não têm qualquer tipo de sobrepressão, sendo que a sua maior limitação prende-se com o facto de apresentarem uma área de superfície reactiva relativamente pequena. Para contrabalançar esta situação, recorre-se à estratégia de paragem de fluxo, aumentando assim o tempo de residência dentro do sistema ou aumenta-se o tamanho do reactor, sem que isto implique um aumento desproporcionado da dispersão da zona de amostra. Neste sentido, Min et al. publicaram dois estudos em que a montagem SIA incorporava reactores enzimáticos tubulares com um comprimento igual a 1 m, cujo suporte de imobilização era um tubo de nylon modificado por *o*-alquilação [26, 36]. O primeiro estudo [36] visou a determinação simultânea de glucose, ácido láctico e penicilina para a monitorização de cultivos de fungos *Penicillium chrysogenum*. A determinação da glucose e do ácido láctico era baseada na conversão enzimática, utilizando GOD e lactato oxidase, respectivamente, com formação de peróxido de hidrogénio e consequente reacção quimiluminimétrica com o luminol catalisada pelo hexacianoferrato de potássio. No caso da determinação da penicilina, esta era baseada na formação do ácido penicilóico, por acção da penicilinase, que depois reagia com o iodo e a detecção da quantidade remanescente de iodo era efectuada por via quimiluminimétrica utilizando o luminol. Com base na mesma abordagem, os autores procederam à monitorização em linha da glucose e da penicilina num caldo de fermentação de *Penicillium chrysogenum* [26]. Neste caso, os autores adoptaram a estratégia de paragem de fluxo bem como promoveram a propulsão e a aspiração da zona da amostra no reactor tubular com GOD, para aumentar o rendimento da conversão enzimática da glucose. O ácido penicilóico era determinado quimiluminimetricamente, conforme descrito anteriormente, ou espectrofotometricamente pelo método iodométrico clássico, onde o consumo de iodo era determinado pelo decréscimo de absorvância (descoloração) do complexo de iodo-amido. Liu e Hansen [37] também propuseram um sistema SIA com um reactor tubular de nylon contendo a GOD imobilizada para a determinação de glucose em caldos de fermentação. A estratégia seguida foi semelhante à de Min et al. [36]. Neste caso, é implementado um período de paragem de fluxo após a propulsão da amostra para o reactor enzimático.

Com o intuito de obviar a associação dos sistemas SIA a baixos ritmos de amostragem, Segundo e Rangel [29] conceberam uma nova configuração de sistema

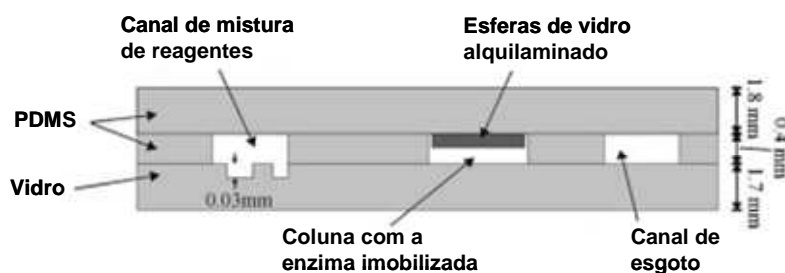


SIA, no qual foram incorporadas uma válvula de injeção e uma bomba peristáltica adicional, para a determinação do glicerol e do etanol em vinhos. Os reactores contendo glicerol desidrogenase e álcool desidrogenase foram colocados nas alças da válvula de injeção de 8 portas. Assim, numa primeira fase, o cofactor  $\text{NAD}^+$  e a amostra eram aspirados para o TA e, após inversão do sentido de fluxo, estas zonas eram propulsionadas para uma das alças onde estava localizada um reactor enzimático, enquanto que a outra alça era continuamente lavada com transportador com o auxílio da bomba peristáltica adicional. Numa segunda fase, após um determinado período de paragem, a posição da válvula de injeção era trocada, possibilitando o envio do NADH formado para o detector, o qual era determinado espectrofotometricamente a 340 nm, e o envio do transportador através do outro reactor enzimático. Posteriormente, esta sequência de operações era repetida para o outro reactor.

Foram desenvolvidos dois sistemas SIA que incorporavam reactores enzimáticos colocados sequencialmente, em que o produto formado após a passagem no primeiro reactor era depois enviado para o segundo reactor [28, 41]. Peña et al. [28] imobilizaram a  $\alpha$ -quimotripsina e a AOD para a conversão do aspartame em peróxido de hidrogénio, o qual era misturado, por confluência de zonas imediatamente antes do tubo de reacção, com a solução reagente de desenvolvimento de cor, formada pelo ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) e pela POD, com produção do catião radical ABTS (420 nm). O sistema proposto foi aplicado à determinação do aspartame em adoçantes comerciais. Alhadeff et al. [41] imobilizaram a AOD e a POD com vista à determinação de etanol em bebidas alcoólicas destiladas e não destiladas, bem como à sua monitorização num caldo de fermentação alcoólica. Contrariamente ao sistema proposto por Lapa et al. [27], em que a unidade de diálise incorporada no sistema SIA permitia o ajuste dos níveis de concentração de etanol no caldo de fermentação à zona de resposta linear do método, no presente estudo a amostra era filtrada e diluída manualmente antes da sua introdução no sistema. A estratégia proposta por estes autores contemplava um período de paragem de fluxo no reactor da AOD para maximizar a conversão enzimática do etanol. O peróxido de hidrogénio formado nesta reacção era depois enviado para o segundo reactor, que continha a POD imobilizada. No trabalho desenvolvido por Araujo et al. [30] para a determinação da glucose em leites, a GOD e a POD foram co-imobilizadas e dispostas de forma sequencial de forma que o peróxido formado da oxidação da glucose actuasse como o substrato da POD. Contrariamente à estratégia proposta por Peña et al. [28], nestes dois trabalhos quer a amostra quer o reagente cromogénico (composto pela 4-aminofenazona e pelo fenol) tinham que ser propulsionados para o detector através do próprio reactor enzimático, com formação de um produto corado, o que pode condicionar o tempo de vida operacional do reactor enzimático.

A incorporação de reactores enzimáticos em sistemas SIA pode também ser usada com o objectivo de minimizar interferências [42]. Sendo o ácido úrico um constituinte das amostras de humor vítreo e também o produto de oxidação do analito hipoxantina, foi necessário introduzir outro reactor, com uricase imobilizada, conectado a uma das portas laterais da válvula selectora, para reduzir a quantidade de ácido úrico antes da determinação do analito. De seguida, por activação de uma válvula solenóide a amostra era direccionada para o reactor com xantina oxidase imobilizada, ou para um reactor de iguais dimensões que continha apenas esferas de vidro alquilaminado (realizando desta forma um branco das amostras, dado o teor de ácido úrico remanescente). Decorrido o período de paragem de fluxo, o fluido era finalmente propulsionado para o sistema de detecção, onde era medido o ácido úrico a 290 nm. O sistema desenvolvido permitia a determinação conjunta do teor de hipoxantina e de potássio (por potenciometria) em amostras de humor vítreo, para uma estimativa mais exacta do intervalo *post mortem*.

Xu e Fang [31] procederam à imobilização da GOD em esferas de vidro alquilaminado e aprisionaram-nas de uma forma peculiar nas paredes de um dos canais de um microchip microfluídico de polidimetilsiloxano (PDMS) (Figura 1.8.). A aplicabilidade deste sistema microfluídico desenvolvido consistiu na determinação da glucose, como analito modelo, por detecção quimiluminimétrica. Neste sistema SIA, o luminol e o hexacianoferrato de potássio eram continuamente propulsionados por gravidade para o microchip microfluídico e misturados com o segmento de amostra enviado para o reactor enzimático (com formação de peróxido de hidrogénio) através da válvula selectora, devido ao percurso sinuoso imprimido pelos canais microfluídicos desenhados.



**Figura 1.8.** Representação esquemática de um corte transversal do chip microfluídico, na qual pode ser observada a coluna enzimática imobilizada. Copyright 2004 Elsevier Science Publishers.

Por último, Sohn et al. [47] elaboraram um estudo sobre a imobilização da GOD e da lactato desidrogenase em nanopartículas magnéticas activadas com glutaraldeído. As partículas imobilizadas de GOD foram depois empacotadas num tubo de silicone, o qual foi integrado num sistema SIA, para determinação da glucose com potencial aplicação a processos de monitorização de bioprocessos. A amostra e o substrato cromogénico (ABTS e POD) eram enviados sequencialmente para o reactor empacotado com GOD, sendo o ABTS oxidado medido espectrofotometricamente a 405 nm.

Foram reportados outros processos de imobilização que dispensavam o uso do glutaraldeído como agente funcionalizador do suporte utilizado [32, 38, 48-50].

A integração da enzima imobilizada no próprio detector, que conduz a uma simplificação do sistema de fluxo, foi também explorada [32, 50]. Haberkorn et al. [32] conceberam um sensor de infravermelho médio do tipo “flow-through” para a monitorização *in situ* da reacção enzimática da amiloglucosidase (AMG) com os hidratos de carbono. Esta enzima era imobilizada em esferas de agarose modificadas e colocada na célula de infravermelho. As soluções de calibração de maltose eram preparadas dentro do próprio sistema a partir da solução mãe, numa câmara de mistura colocada numa entrada da válvula selectora, e de seguida enviadas para o sensor, com aquisição do sinal analítico durante 10 minutos por espectrofotometria de absorção no Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O método proposto foi depois aplicado à determinação do teor de hidratos de carbono em cervejas utilizando o método de adição padrão. Recentemente, Armenta et al. [50] do mesmo grupo, adoptaram a mesma estratégia de imobilização para a acetilcolinesterase, bem como a mesma configuração do sistema SIA, para a determinação da actividade enzimática e sua inibição (secção 1.2.2.).

Rhee [38] e Laiwattanapaisal et al. [48] reportaram dois métodos de imobilização enzimática distintos dos anteriores. O primeiro [38] incorporou no sistema um reactor em que a trealase se encontrava imobilizada num suporte polimérico, que convertia a trealose em glucose com vista à monitorização em linha da concentração da trealose num tanque de agitação como simulador da monitorização de bioprocessos. Os segundos [48] procederam à co-imobilização da L-glutamato desidrogenase e da D-fenilglicina aminotransferase em microesferas de poliestireno num microchip de silício, que possibilitava a implementação de uma reacção de amplificação de resposta ao NADH formado a partir do substrato L-glutamato. A introdução e a remoção (no caso de um decréscimo da actividade enzimática) destas esferas eram efectuadas automaticamente através do sistema SIA microfluídico.

O uso de extractos brutos e/ou tecidos vegetais pode apresentar em alguns casos uma certa desvantagem na selectividade do método analítico e na própria reprodutibilidade dos ensaios aquando do uso de novo extracto. Por outro lado são extremamente económicos e geralmente possuem um tempo de vida superior quando comparados com as enzimas purificadas, visto que ao se encontrarem naturalmente imobilizadas, nas células dos materiais biológicos (habitat natural), são mais estáveis, além de geralmente possuírem o seu cofactor disponível [24]. Neste âmbito, Mei et al. [49] imobilizaram um extracto bruto de folhas de plântula de ervilha, como fonte da enzima diamina oxidase, para a determinação quimiluminimétrica de diaminas, como a putrescina e a cadaverina, em amostras de peixe. A coluna de teflon com o tecido vegetal encontrava-se conectada a uma das portas laterais da válvula selectora do sistema SIA. O ciclo analítico compreendia a aspiração da amostra a partir da porta lateral onde se encontrava a coluna, ocorrendo a oxidação das diaminas com produção de peróxido de hidrogénio, e a subsequente reacção com o luminol catalisada pelo cobalto.

#### 1.2.1.1.2. Sistemas SIA baseados em biosensores enzimáticos

Os biosensores enzimáticos são dispositivos formados basicamente por duas partes: sensor e enzima imobilizada. O sensor electroquímico, de acordo com o seu princípio de funcionamento, poderá ser amperométrico ou potenciométrico, sendo a escolha função da substância a ser medida, a qual por sua vez será determinada pela enzima particular empregue. A integração da enzima no detector conduz a uma simplificação do sistema SIA. A dispersão nestas montagens é significativamente reduzida contribuindo assim para um aumento da sensibilidade do método, uma vez que as mudanças na concentração dos bioreagentes responsáveis pelo sinal analítico obtido decorrem directamente na superfície do detector.

Por outro lado, a integração do biosensor num sistema SIA limita a optimização do próprio biosensor. As condições óptimas de operação do detector e da enzima são em muitos casos diferentes e como tal a optimização tem que ser efectuada como um compromisso de ambas, o que influirá negativamente na eficiência do sistema de biodeteção. Uma das desvantagens possíveis relaciona-se com o efeito de memória dos biosensores e consequentemente com o longo período para o retorno à linha de base. Esta desvantagem pode ser minimizada com a escolha de um método de imobilização enzimática que possibilite uma penetração eficiente na camada biocatalítica bem como o transporte de espécies através da mesma. Em última análise, a escolha do método de imobilização condicionará o tempo de vida operacional da camada biocatalítica e por inerência o tempo de vida útil do biosensor.

Os biosensores enzimáticos incorporados em sistemas SIA são maioritariamente amperométricos. Os eléctrodos à base de carbono representam o material mais utilizado na construção destes biosensores. O motivo para tal prende-se com as vantagens que estes materiais oferecem tais como, um fácil manuseamento e um baixo custo quando comparado com, nomeadamente, ouro ou platina [34, 51]. De entre os tipos de eléctrodos utilizados em sistemas de fluxo destacam-se os eléctrodos de pasta de carbono, grafite, carbono vítreo e fibra de carbono.

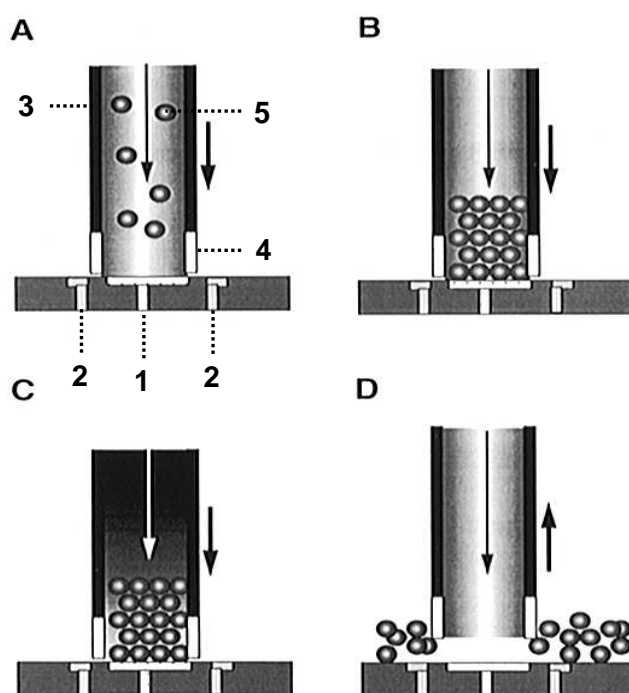
Os sistemas baseados em biosensores enzimáticos têm sido aplicados à monitorização de analitos em caldos de fermentação. Schuhmann et al. [52] desenvolveram um sistema SIA de elevada flexibilidade que permitia o controlo simultâneo até quatro fermentadores ou quatro zonas de amostragem diferentes num único fermentador. O sistema foi aplicado à determinação de glucose e lactato em caldos de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*. Para o efeito, a GOD e a lactato oxidase foram imobilizadas em poliuretano e fixadas ao respectivo eléctrodo entre duas membranas de diálise, para a detecção amperométrica do peróxido de hidrogénio

formado. Mais tarde, o mesmo grupo de investigação [33] reportou o desenvolvimento de um biosensor amperométrico para a determinação do etanol em bebidas. O biosensor era preparado por ligações cruzadas da enzima álcool desidrogenase a um complexo polimérico na superfície de eléctrodos de grafite ou eléctrodos impressos (“Screen-Printed Electrode”, em inglês). Este biosensor, quando integrado num sistema SIA, com configuração similar ao descrito anteriormente [52], permitiu a monitorização em linha de etanol em processos de fermentação de vinhos, para além da determinação do seu teor em vinhos. Kurzawa et al. [51] apresentaram uma nova tecnologia de imobilização enzimática baseada na deposição local de filmes poliméricos contendo enzimas, por indução electroquímica. Para o efeito, foi construído um biosensor de glucose baseado no aprisionamento da GOD (por precipitação do polímero) na superfície do eléctrodo de platina e a sua estabilidade a longo prazo foi avaliada com uma montagem SIA semelhante à mencionada anteriormente [52].

A aplicabilidade dos sistemas baseados em biosensores enzimáticos estendeu-se à determinação de analitos de interesse no campo farmacêutico. Stefan et al. [53-63] desenvolveram vários sistemas SIA para a determinação de compostos farmacêuticos utilizando biosensores amperométricos. Nalguns trabalhos, foram construídos biosensores bienzimáticos [58-60] e mesmo multienzimáticos [63]. Por outro lado, um dos sistemas propostos [55] apresentava também um biosensor potenciométrico para a determinação do S-captopril. A pasta de carbono representou o material mais utilizado na construção dos biosensores enzimáticos empregues como detectores nos sistemas SIA referidos. No que respeita à configuração dos próprios sistemas SIA, estes eram semelhantes, apresentando um tubo de armazenamento e, um ou dois tubos reaccionais, de acordo com a determinação ser respectivamente de um ou dois enantiómeros [53, 55, 57-59]. Estes sistemas desenvolvidos mostraram-se úteis para o controlo em linha de processos de síntese e permitiam também a resolução de enantiómeros. Recentemente, Gomes et al. [34] construíram um biosensor amperométrico para a determinação de lactato em produtos farmacêuticos. A lactato oxidase foi incorporada na superfície do eléctrodo de platina usando a tecnologia sol-gel.

Mayer e Ruzicka [64] apresentaram uma nova classe de sensores electroquímicos com o uso de esferas (designadas pelos autores de “beads”) condutoras (partículas de carbono vítreo) para formar eléctrodos descartáveis bem como de esferas não condutoras (oxirano e de vidro alquilaminado) para formar camadas renováveis de enzimas imobilizadas. Para o efeito, testaram-se diferentes oxidases: galactose, lactato, álcool e glucose oxidases, e os biosensores resultantes das duas últimas foram aplicados à determinação de etanol e glucose em cervejas e vinhos. O sistema SIA era então conectado a uma célula de fluxo especialmente desenhada para proporcionar a

renovação da sua superfície, denominada de “jet ring cell” (Figura 1.9.). A suspensão de beads com enzima imobilizada era introduzida no sistema através da válvula selectora, sendo aprisionada na “jet ring cell” (Figura 1.9., etapa A) e depois formando como que uma coluna empacotada de beads (etapa B). De seguida, o analito era aspirado e transportado até às beads (etapa C) com formação de peróxido de hidrogénio (produto comum às reacções enzimáticas envolvidas), o qual era medido amperometricamente. A particularidade da célula de fluxo residia na possibilidade de reter as beads sobre a superfície condutora enquanto se realizava a análise, e proceder ao descarte das beads quando se impunha a sua substituição, por propulsão do fluxo para o esgoto, após abertura do intervalo existente entre a “jet ring cell” e o eléctrodo auxiliar (etapa D). Desta forma, a estratégia era bastante vantajosa na medida em que proporcionava uma porção de enzima nova em cada ensaio, evitando, desta forma, contaminações da superfície do sensor em ensaios subsequentes. Por último, os ensaios efectuados com a GOD imobilizada em partículas de carbono vítreo, usadas como sensores amperométricos servindo assim de mediação para o processo electroquímico, confirmaram a eficácia de renovação da enzima e da própria superfície do eléctrodo numa só etapa.



**Figura 1.9.** Esquema representativo de uma célula de fluxo “jet ring cell”. 1 – eléctrodo de trabalho; 2 – eléctrodo de referência; 3 – eléctrodo auxiliar; 4 – PTFE; 5 – beads; A) inserção das beads na célula de fluxo; B) acomodação das beads sobre a superfície do sensor; C) propulsão da amostra e monitorização amperométrica; D) purga das beads. Copyright 1996 American Chemical Society.

Lindfors et al. [65] utilizaram a mesma abordagem para a determinação de glucose. O sistema SIA era conectado à célula de fluxo “jet ring cell”, que continha um suporte sólido renovável, constituído por esferas de agarose com GOD imobilizada. De modo similar, a suspensão de esferas era introduzida no sistema através da válvula selectora, sendo aprisionada na célula de fluxo. A subsequente injeção de glucose originava a formação de peróxido de hidrogénio, o qual era medido amperometricamente. Posteriormente, a suspensão era removida de forma diferente da reportada anteriormente, através da inversão de fluxo, e substituída por uma nova suspensão para a determinação de glucose subsequente.

Recentemente, Gutes et al. [35] propuseram uma “língua electrónica enzimática” para a determinação voltamétrica da glucose. Este arranjo consistia em três biosensores contendo GOD e três catalisadores metálicos distintos, permitindo desta forma uma resposta diferenciada para as espécies primárias e interferentes. Os resultados obtidos eram tratados recorrendo a ferramentas quimiométricas, nomeadamente por modelização de redes neuronais artificiais. Esta célula de fluxo conectada ao sistema SIA foi aplicada à determinação da glucose em sumos de fruta na presença de um interferente clássico, o ácido ascórbico. O sistema SIA apresentava uma câmara de mistura conectada a uma das portas da válvula selectora para a preparação automática dos padrões de glucose e ácido ascórbico.



#### **1.2.1.2. Utilização das enzimas livres em solução**

A utilização das enzimas livres em solução no formato SIA para a determinação de analitos tem tido uma expressão semelhante à sua utilização na forma imobilizada, contrariamente ao formato FIA. Este modo de utilização das enzimas é interessante pela sua praticabilidade, pois possibilita a aplicação directa do produto na sua forma comercial, evitando desta forma os procedimentos complicados inerentes à imobilização enzimática, que pode conduzir a um certo grau de inactivação enzimática e por outro lado implica o emprego de enzima em grandes quantidades.

A Tabela 1.2. apresenta uma selecção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas livres em solução em sistemas SIA, desde sistemas monoenzimáticos a multienzimáticos.

**Tabela 1.2.** Seleção de aplicações que envolvem a utilização de enzimas livres em solução (sistemas mono-, bi- e multienzimáticos) em sistemas SIA

Análito(s)	Área de aplicação/Matriz	Sistema enzimático	Sistema de de detecção	Intervalo linear	Limite de detecção	Ritmo de determinação (h <sup>-1</sup> )	Ref.
L(-) malato	Alimentar/Vinhos	L-malato desidrogenase	Espectrofotometria (Ultravioleta)	0,01 – 0,15 g L <sup>-1</sup>	0,009 g L <sup>-1</sup>	22	[66]
Alopurinol	Farmacêutica/Formulações farmacêuticas	Xantina oxidase	Espectrofotometria (Ultravioleta)	Tempo fixo: 25 – 75 µmol L <sup>-1</sup> Cinético: 5 – 25 µmol L <sup>-1</sup>	6,2 µmol L <sup>-1</sup> 1,3 µmol L <sup>-1</sup>	15 34	[67]
Nitratos e nitritos	Clinica e ambiental/Soros e águas	Nitrato redutase	Espectrofotometria (Visível)	Soros: 0,4 – 4 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) 0,1 – 3 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Águas: Até 50 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) Até 3 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	0,14 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) 0,03 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) 0,73 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) 0,03 mg L <sup>-1</sup> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	12 (6 para NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e 6 para NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	[68, 69]
Ureia	Ambiental e Alimentar/Fertilizantes e Leites	Extracto bruto de urease	Electroquímica (potenciometria)	1,0x10 <sup>-3</sup> – 1,0x10 <sup>-2</sup> mol L <sup>-1</sup>	6,0 x 10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup>	20	[70]
Glucose	Biotecnologia/Caldos de fermentação	Glucose oxidase e peroxidase	Espectrofotometria (Visível)	0,04 - 5 g L <sup>-1</sup>	–	–	[71]
Glucose	Geral	Glucose oxidase e peroxidase	Espectrofotometria (Visível)	100 – 1000 mg L <sup>-1</sup>	–	120	[72]
L(+)-lactato	Alimentar/Vinhos	Lactato oxidase e peroxidase	Espectrofotometria (Visível)	0,25 – 2,5 g L <sup>-1</sup>	0,074 g L <sup>-1</sup>	14	[73]
Metanol	Biotecnologia/Caldos de fermentação	Álcool oxidase e peroxidase	Espectrofotometria (Visível)	0,5 – 2 g L <sup>-1</sup>	0,12 g L <sup>-1</sup>	7	[74]
Glicerol e glucose	Biotecnologia/Caldos de fermentação	Reagente enzimático multicomponente (glicerol cinase, glicerol fosfato oxidase e POD; hexocinase e glucose-6-fosfato desidrogenase)	Espectrofotometria (Visível/Ultravioleta)	Glicerol: 20 – 120 mg L <sup>-1</sup> Glucose: 35 – 1000 mg L <sup>-1</sup>	–	–	[75]
Pirofosfato	Clinica/Urinas	Reagente enzimático multicomponente (aldolase, frutose-6-fosfato cinase dependente de pirofosfato, glicerol fosfato desidrogenase e triosefosfato isomerase)	Espectrofotometria (Ultravioleta)	0,4 – 20 mg L <sup>-1</sup>	0,38 mg L <sup>-1</sup>	1,8	[76]

A maioria das aplicações que empregam enzimas em solução para a determinação de analitos envolve a utilização de apenas uma enzima. As matrizes utilizadas são na maioria de índole alimentar, mas surgem também aplicações nos campos farmacêutico [67], biológico [68, 76] e ambiental [69, 77].

Segundo e Rangel [66] desenvolveram um sistema SIA com vista à determinação de L(-) malato em vinhos. Para o efeito, implementaram um método cinético baseado na medição da velocidade de formação de NADH (340 nm), resultante da reacção catalisada pela L-malato desidrogenase, aquando da paragem de fluxo no detector da zona composta de amostra,  $\text{NAD}^+$  e enzima. A principal vantagem da implementação do método cinético prendia-se com o facto de permitir eliminar a interferência devido à absorção intrínseca das amostras de vinho, já que neste método era medida a variação do sinal (absorvância) ao longo do tempo. Mais tarde, Oliveira et al. [78] e Dominguez et al. [79] aplicaram a mesma estratégia e o mesmo sistema base para a determinação de glicerol em vinhos e cervejas e em processos de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente. Nestes casos, a enzima empregue foi a glicerol desidrogenase. Páscoa et al. [80] implementaram a determinação de etanol em vinhos, mas contrariamente aos trabalhos anteriores, a paragem de fluxo era implementada no próprio tubo reacção, para promover a reacção da amostra, do cofactor e da álcool desidrogenase, com formação do NADH, o qual era depois encaminhado para o detector.

De forma genérica, a determinação pode ser efectuada em tempo fixo, através da medição dos sinais transientes obtidos, ou em modo cinético, com a monitorização do produto formado durante o período de paragem de fluxo no detector e subsequente cálculo das velocidades iniciais de reacção. Silvestre et al. [67] e Vidigal et al. [81] adoptaram ambas as estratégias na determinação do alopurinol em produtos farmacêuticos baseada na inibição da xantina oxidase e do etanol em vinhos, respectivamente. Mais tarde, Vidigal et al. [82], aproveitando a versatilidade do sistema obtido, propuseram uma metodologia baseada na monitorização do peróxido de hidrogénio em soluções de limpeza e de desinfecção de lentes de contacto. Na presente aplicação, a determinação era apenas efectuada em tempo fixo, com a medição do sinal transiente correspondente ao radical catião ABTS formado. O sistema miniaturizado lab-on-valve incluía uma unidade de diálise, acoplada a uma das portas laterais da válvula selectora, que permitia uma diluição acentuada da amostra em linha, pois as soluções de limpeza apresentavam teores elevados de peróxido de hidrogénio.

Considerando ainda a matriz alimentar, foram propostos dois sistemas SIA de características diferentes para a determinação da glucose em bebidas energéticas e mel. O primeiro era um sistema SIA híbrido, em que a válvula selectora (característica dos sistemas SIA) permitia a introdução da amostra e da GOD e o fluxo unidireccional e

contínuo (característico dos sistemas FIA) aplicado permitia a mistura rápida em confluência do peróxido de hidrogénio formado com o luminol, imediatamente antes do detector [83]. O segundo era um sistema SIA convencional, que graças à ordem de aspiração adoptada bem como às condições experimentais implementadas, permitia acomodar a reacção de QL [84]. Para tal, foi implementado um período de paragem de fluxo após a aspiração dos segmentos de amostra e GOD para o TA, para aumentar a eficiência de conversão enzimática da glucose, e foi utilizado um catalisador da reacção de QL (cobalto). Adicionalmente, este sistema tinha a particularidade de incluir um canal de diluição acoplado a uma das portas laterais da válvula selectora, que permitia a diluição automática em linha das amostras, adequando assim o seu teor de glucose ao intervalo de linearidade do método proposto.

Samanta et al. [77] e Pinto et al. [69] reportaram dois estudos sobre a determinação enzimática de analitos em águas. Os primeiros [77] implementaram um método cinético baseado no lisado de amebócito *Limulus* (LAL) para a determinação de endotoxinas bacterianas em água de torneira. O LAL contém várias proteases, que em presença das endotoxinas, promovem a hidrólise de um substrato cromogénico sintético, que era monitorizado espectrofotometricamente durante o período de paragem de fluxo no detector. Os segundos [69] implementaram a determinação de nitratos e nitritos em águas de diferentes origens, através da reacção de Griess–Ilosvay, com a incubação faseada da amostra, da enzima nitrato redutase e dos restantes reagentes numa câmara de mistura conectada a uma porta lateral da válvula selectora. O sistema SIA desenvolvido incluía ainda um tubo de diluição acoplado a uma das portas laterais da válvula selectora, que permitia a diluição em linha das amostras de água que possuíam teores de nitratos superiores a 50 mg L<sup>-1</sup>. Estes autores utilizaram a mesma abordagem para a determinação dos nitratos e nitritos em amostras de soro, que constituem marcadores habitualmente usados como indicadores em muitas doenças [68].

O uso de extractos brutos em alternativa às enzimas purificadas comerciais foi também proposto em duas aplicações envolvendo sistemas monoenzimáticos em solução. Silva et al. [70] conceberam um sistema SIA para a determinação de ureia em amostras de fertilizantes e leite, recorrendo ao extracto bruto de *Canavalia ensiformis* como fonte de urease. O sistema analítico era semelhante ao proposto por Lima et al. [85] para a mesma determinação, com a diferença deste último oferecer uma maior versatilidade na etapa de detecção ao incluir dois sistemas de detecção: detecção espectrofotométrica, através da mudança de cor de uma solução de indicador de azul de bromotimol e detecção condutimétrica, com a formação do ião borato a partir de uma solução de ácido bórico. Decorrida a hidrólise enzimática da ureia num TA adicional (termostatizado a 30 °C), promovida com um período de paragem de fluxo, as zonas de

amostra e extracto eram enviadas para o canal dador da unidade de difusão gasosa. O amoníaco produzido difundia-se para o canal aceitador, onde ocorria a sua conversão a ião amónio, que era medido num eléctrodo selectivo a esta espécie. Mais tarde, os mesmos autores [86] utilizaram uma solução de extracto de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, como fonte de invertase, para a hidrólise de hidratos de carbono do açúcar da cana e do milho. A hidrólise enzimática da sacarose ocorria de modo similar aos dois trabalhos anteriores, e de seguida, ocorria a redução de periodato pelos açúcares redutores formados, sendo o periodato remanescente medido com um eléctrodo selectivo a esta espécie.

Foram desenvolvidos dois sistemas SIA monoenzimáticos com finalidades distintas das descritas anteriormente [87, 88]. No primeiro estudo, foi implementado um ensaio de inibição enzimática baseado na reacção hidrolítica de um substrato de fluoresceína pela  $\beta$ -galactosidase para demonstrar a aplicabilidade de uma bomba de escoamento electrosmótico a sistemas SIA microfluídicos [87]. O segundo estudo compreendeu a exploração da reacção enzimática da POD para a avaliação da capacidade sequestrante ("scavenging") do peróxido de hidrogénio através da oxidação do substrato ácido homovanílico ao seu dímero fluorescente [88]. O presente estudo confirmou a exequibilidade dos sistemas SIA para a automatização de reacções químicas envolvendo três ou mais reagentes e permitiu avaliar os principais factores que influenciam a dispersão de zonas nestes sistemas.

Considerando as aplicações envolvendo duas enzimas, Chung et al. [71] desenvolveram um sistema SIA para a monitorização em linha e em intervalos de tempo pré-programados da glucose em caldos de fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*. A reacção utilizada era a reacção de Trinder, a qual se baseia na formação de uma quinonimina por reacção entre o peróxido de hidrogénio (resultante da acção da GOD sobre o analito glucose), fenol e aminoantipirina, catalisada pela POD. A medição era efectuada por paragem de fluxo do produto reaccional no detector e com subsequente monitorização da absorvância ( $\lambda=504$  nm) ao longo do tempo. Chen e Ruzicka [72] desenvolveram um sistema lab-on-valve para a determinação rápida da glucose e do etanol. A glucose era também determinada pelo sistema bienzimático GOD/POD, com formação de uma quinonimina ( $\lambda=500$  nm). A determinação do etanol era efectuada apenas com a álcool desidrogenase (e o cofactor  $\text{NAD}^+$ ), por medição do NADH formado. Os ensaios foram conduzidos a 22°C e a 37 °C utilizando reagentes de kits enzimáticos. O ritmo de amostragem era comparável ao reportado em sistemas FIA graças ao grau de miniaturização atingido e ao aproveitamento do tempo da paragem de fluxo do produto reaccional no detector para a aspiração das zonas de amostra e reagentes referentes à

análise seguinte. Recentemente, Araujo et al. [30] empregou a GOD e a POD para a determinação da glucose em leites em dois sistemas SIA. As enzimas foram usadas em meio homogéneo (livres em solução) e heterogéneo (imobilizadas, discutido na secção 1.2.1.1.1.). O ciclo analítico envolvia a avaliação do branco da amostra de leite. Numa segunda fase, no caso das enzimas em solução, o reagente enzimático e a amostra, depois de aspirados para o TA, eram propulsionados através de um tubo de reacção termostatzado (37 °C) para o detector.

Têm sido desenvolvidos sistemas SIA baseados noutros sistemas bienzimáticos, constituídos pela lactato oxidase [73] ou pela AOD [74], com a POD.

Araujo et al. [73] desenvolveram um sistema SIA para a determinação espectrofotométrica do L(+)-lactato em vinhos. O sistema incorporava uma unidade de diálise entre o dispositivo propulsor e a válvula selectora que permitia a diluição em linha e minimizava as interferências provenientes da matriz da amostra. O canal superior da unidade de diálise encontrava-se conectado à porta central da válvula selectora e o canal inferior preenchido com transportador em estado estacionário funcionava como câmara de armazenamento do analito. A amostra e reagentes eram aspirados para a unidade de diálise, onde eram implementados períodos de paragem de fluxo, e no final promovia-se o envio do produto formado, uma quinonimina ( $\lambda=510$  nm), para o detector.

Com vista à monitorização em linha do metanol em caldos de fermentação de *Pichia pastoris*, nas quais uma lipase recombinante de *Rhizopus oryzae* estava a ser produzida, Surribas et al. [74] conceberam um sistema SIA que incluía uma câmara de diluição (câmara de mistura), que permitia ajustar a concentração de metanol da amostra (até 2 g L<sup>-1</sup>) ao intervalo linear do método, bem como uma válvula rotatória que permitia a realização da amostragem, ambas conectadas a portas laterais da válvula selectora. O ciclo analítico consistia na aspiração intercalada das soluções enzimáticas (AOD e POD), reagentes e amostra para o TA. Após um período de paragem de fluxo, ocorria a inversão de fluxo e envio da quinonimina formada para o detector, sendo medida espectrofotometricamente a 470 nm.

Nalgumas aplicações, é empregue um reagente enzimático multicomponente (Tabela 1.2.).

Wu et al. [75] desenvolveram um sistema miniaturizado lab-on-valve para a monitorização da fermentação da *Escherichia coli*. Para o efeito, foram efectuadas as determinações da amónia, do ferro livre, do glicerol e da glucose. Estes dois últimos sofriam a acção de um reagente enzimático multicomponente, resultando na formação de uma quinonimina, determinada espectrofotometricamente a 540 nm, ou do NADH, medido a 340 nm, respectivamente. Estas determinações eram efectuadas aquando da

paragem da zona composta de glicerol ou glucose e do respectivo reagente enzimático multicomponente na célula de fluxo.

Simonet et al. [76] desenvolveram um sistema SIA para a determinação de pirofosfato em urina. Na presente aplicação, a amostra e a solução reagente multienzimática eram aspiradas sequencialmente para o TA e após um período de 15 minutos a mistura era propulsionada para o detector. A diminuição da concentração de NADH, proporcional à quantidade de pirofosfato, era medida espectrofotometricamente a 340 nm. No caso das amostras de urina, era necessário efectuar a correcção do branco das amostras, dada a absorção intrínseca das mesmas a este comprimento de onda.

### 1.2.2. Emprego das enzimas em ensaios de actividade e inibição enzimática

Os esquemas enzimáticos para a determinação de substratos descritos na secção 1.2.1. podem ser facilmente adaptados para os ensaios de actividade das enzimas empregues. Neste sentido, utilizando o mesmo sistema de detecção e adoptando uma determinada concentração de substrato constante, os sinais analíticos obtidos no sistema SIA, após um certo período de reacção enzimática, são função da actividade da enzima utilizada. A própria actividade enzimática pode ainda ser determinada a partir da velocidade da reacção que a própria catalisa sob condições específicas.

Os procedimentos bioanalíticos, quer orientados para a determinação da actividade enzimática quer baseados na inibição enzimática, podem ser facilmente implementados no formato SIA. Adicionalmente, é importante mencionar que a determinação da actividade enzimática abre a oportunidade para outras aplicações analíticas relacionadas com a determinação indirecta de compostos que influem na sua actividade.

Ruzicka e Gübeli [89] reportaram o primeiro estudo de determinação da actividade enzimática implementado num sistema SIA. A enzima monitorizada foi uma enzima proteolítica do tipo da subtilisina (savinase), a qual se encontra nas partículas do ar, que despoletam reacções asmáticas quando inaladas, mesmo em quantidades vestigiais, dado o seu elevado potencial alergénico. O substrato empregue foi um tripeptídeo, contendo 7-amino-4-metilcumarina como fluoróforo. Uma determinada secção da zona composta de amostra (enzima) e reagente era aprisionada no detector, permitindo assim a medição da velocidade de reacção da hidrólise do substrato. Mais tarde, a mesma determinação foi implementada num sistema lab-on-valve, permitindo uma diminuição significativa das quantidades de reagente e amostra [6].

O principal domínio de aplicações dos sistemas SIA desenvolvidos para a determinação da actividade enzimática prende-se essencialmente com enzimas de produção industrial. Neste âmbito, foram propostos diferentes sistemas SIA com vista à determinação de enzimas como a AMG, a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -fructofuranosidase, de extrema importância na indústria alimentar. As estratégias para a quantificação da actividade enzimática compreendiam a incubação da amostra (enzima) e do substrato numa câmara de mistura [90-92] ou num tubo de reacção [93] termostatizados, acoplados a uma das portas da válvula selectora.

Hansen et al. [90] conceberam um sistema SIA para a determinação da actividade enzimática da AMG, a qual intervém no processo de fermentação, degradando a maltose



a  $\alpha$ -D-glucose. A determinação era depois efectuada com o envio para o detector da zona de reagente enzimático, constituído pela mutarotase, glicerol desidrogenase e  $\text{NAD}^+$ , e de uma alíquota da câmara de mistura, com medição do NADH formado após a implementação de um período de paragem de fluxo.

Schindler et al. [91] implementaram a determinação da actividade da  $\beta$ -fructofuranosidase com detecção por FTIR. Após um período de incubação de 3 minutos da sacarose e da amostra, eram registados os espectros da mistura reaccional (substrato sacarose, glucose e frutose) e comparados com o espectro do substrato puro recorrendo a ferramentas quimiométricas, nomeadamente por um modelo de calibração multivariada segundo o método dos mínimos quadrados parciais. Foi também implementado no mesmo sistema a determinação simultânea das actividades da  $\beta$ -fructofuranosidase e AMG [92]. A determinação da actividade da AMG era avaliada a partir da concentração de glucose formada, após subtracção da parcela originada por acção da  $\beta$ -fructofuranosidase. Neste estudo, a quantificação da actividade era efectuada após um período de incubação de 10 minutos.

Min et al. [93] procederam à avaliação da actividade da  $\alpha$ -amilase em cultivos de *Aspergillus oryzae*, através da monitorização da descoloração do complexo azul de iodo-amido (650 nm). Neste caso, o conteúdo do tubo de reacção, correspondente ao amido remanescente, era no final misturado com uma alíquota de iodo e enviados para o detector.

Em alguns trabalhos, é também explorado o efeito inibitório apresentado por certos compostos sobre a actividade da enzima.

Chen et al. [94] desenvolveram um sistema miniaturizado lab-on-valve para efectuar estudos de cinética e inibição enzimática. As enzimas modelo ensaiadas foram a enzima conversora da angiotensina e a acetilcolinesterase. O sistema compreendia uma câmara de mistura, designada de microreactor pelos autores, posicionada numa das portas laterais da válvula selectora, para onde eram enviadas as alíquotas de tampão, enzima, substrato e inibidor (aquando dos estudos de inibição enzimática). A velocidade inicial da reacção era medida no próprio microreactor, com recurso a um sistema de detecção baseado em fibras ópticas. No final do ciclo, o microreactor era esvaziado com uma seringa auxiliar. Para a determinação das constantes cinéticas, a concentração dos reagentes na mistura reaccional foi determinada através de estudos de dispersão com um corante.

Armenta et al. [50] descreveram um sistema SIA para a determinação da actividade da acetilcolinesterase e para estudos de inibição enzimática, mas

contrariamente aos estudos anteriores esta encontrava-se imobilizada, e colocada na célula de infravermelho termostatzada, conforme descrito na secção 1.2.1.1. Diferentes misturas do substrato acetilcolina e de inibidor tacrina (para os estudos de inibição) eram enviadas para o detector, onde ocorria paragem de fluxo. As constantes cinéticas, bem como o efeito inibitório da tacrina, eram depois calculados tendo por base as diferenças espectrais derivadas da própria reacção. Mais tarde, o mesmo grupo [95] utilizou a mesma abordagem para a avaliação da actividade da frutose-1,6-difosfatase e sua inibição pela adenosina 5'-monofosfato, utilizando a frutose-1,6-difosfato como substrato.

Muito recentemente, Vidigal et al. [96] propuseram um sistema miniaturizado lab-on-valve para a determinação da actividade da POD em extractos de vegetais. Esta enzima exerce um efeito negativo na cor e aroma dos alimentos e a sua determinação pode ser um indicador de deterioração dos alimentos e/ou de eficácia de tratamento térmico com à vista à conservação dos mesmos que conduz à inactivação das enzimas. A estratégia de determinação, bem como o próprio ciclo analítico são semelhantes ao trabalho anterior dos mesmos autores [82], com a diferença de neste caso a amostra ser a própria enzima e de ter sido implementado um período de paragem de fluxo no próprio detector, para o registo da variação da absorvância ao longo desse período de tempo que se relacionava com a concentração de POD. O sistema desenvolvido permitiu ainda a monitorização em linha do processo de inactivação térmica da POD.

A avaliação da actividade enzimática foi também efectuada em ambientes diferentes do meio aquoso, considerado o habitat natural das enzimas, nomeadamente em meios contendo líquidos iónicos [97] e micelares [98]. Pinto et al. [97] desenvolveram um sistema SIA para a análise comparativa da actividade da POD na presença de um solvente orgânico convencional, o metanol, e de um líquido iónico, tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio. A actividade enzimática era avaliada comparando os declives das curvas de calibração para o naftol obtidos no meio orgânico e no líquido iónico. O ciclo analítico compreendia a aspiração de pequenas alíquotas de solução aquosa de enzima, peróxido de hidrogénio, naftol e 4-aminoantipirina dissolvidos em misturas de tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio ou metanol/água, seguido do envio das zonas aspiradas através de um tubo de reacção em direcção ao detector. O produto formado era depois medido espectrofotometricamente a 510 nm. Passos et al. [98] também exploraram a avaliação da actividade da POD, em meio micelar relativamente ao meio aquoso. Para o efeito, a oxidação enzimática pelo peróxido de hidrogénio de duas fenotiazinas, uma hidrossolúvel e a outra lipossolúvel (solubilizada em meio micelar) foi implementada num sistema SIA. A determinação era efectuada em tempo fixo, com

paragem do fluxo no tubo reaccional posicionado imediatamente antes do detector, através da monitorização espectrofotométrica a 527 nm do intermediário formado, permitindo assim examinar a cinética da reacção nos dois meios considerados.

### 1.3. Enquadramento geral e objectivos propostos

A incorporação de processos biocatalíticos em procedimentos analíticos permite alargar o leque de analitos que são determinados pelos métodos convencionais e por outro lado melhorar a selectividade destes métodos dada a elevada especificidade do reconhecimento biomolecular exibida pelas enzimas. Os métodos analíticos resultantes são dotados de elevada versatilidade, podendo ser aplicados directamente na determinação dos substratos, produtos ou da actividade enzimática ou indirectamente na determinação de compostos que exerçam efeito sobre a actividade enzimática, tais como inibidores, activadores, cofactores, etc.

A utilização do SIA apresenta características de funcionamento, que parecem facilitar a implementação de métodos enzimáticos, e conduzir a metodologias simples, de elevada eficiência e envolvendo consumos reduzidos de enzima, amostra e restantes reagentes.

Neste contexto, o trabalho apresentado nesta dissertação visa a integração de dois aspectos fundamentais: a utilização das enzimas como ferramentas analíticas e a técnica SIA como um modo de rentabilizar o uso das primeiras, quer em ensaios de rotina, de diferentes áreas de intervenção, quer em estudos sistemáticos. Em cada situação analítica, e em função dos substratos e das relações substrato/enzima que se pretendam monitorizar, serão seleccionadas as condições adequadas à acção biocatalítica das enzimas (pH, temperatura, força iónica do meio, próprio meio reaccional e outras), de acordo com as características destas e com o fim a que o módulo analítico se destina. Serão alvo de automatização ensaios enzimáticos com vista à determinação de substratos ou da actividade enzimática e sua inibição em meios aquosos e em meios não convencionais, como os constituídos por lipossomas, líquidos iónicos e solventes orgânicos. Adicionalmente, dada a versatilidade do SIA, preconiza-se a aplicação de diferentes tipos de intervenção sobre a amostra (diluição, extracção, incubação, entre outras) em linha, de modo a simplificar e melhorar os processos analíticos resultantes e assim proporcionar soluções alternativas atractivas face aos métodos existentes.

#### 1.4. Referências bibliográficas

- [1] Ruzicka J, Hansen EH. Flow Injection Analyses .1. New Concept of Fast Continuous-Flow Analysis. *Anal Chim Acta* 1975; 78 (1): 145-57.
- [2] Skeggs LT. An automatic method for colorimetric analysis. *Am J Clin Pathol* 1957; 28 (3): 311-22.
- [3] Ruzicka J, Marshall GD. Sequential Injection - a New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays. *Anal Chim Acta* 1990 Oct 15; 237 (2): 329-43.
- [4] Reis BF, Gine MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA. Multicommutation in Flow-Analysis .1. Binary Sampling - Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests. *Anal Chim Acta* 1994 Jul 20; 293 (1-2): 129-38.
- [5] Cerda V, Estela JM, Forteza R, Cladera A, Becerra E, Altimira P, et al. Flow techniques in water analysis. *Talanta* 1999 Nov 15; 50 (4): 695-705.
- [6] Ruzicka J. Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *Analyst* 2000; 125 (6): 1053-60.
- [7] Lapa RAS, Lima JLFC, Reis BF, Santos JLM, Zagatto EAG. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. *Anal Chim Acta* 2002 Aug 21; 466 (1): 125-32.
- [8] Ribeiro MFT, Santos JLM, Lima JLFC, Dias ACB, Zagatto EAG. Single reaction interface in flow analysis. *Talanta* 2005 Dec 15; 68 (2): 351-8.
- [9] Gubeli T, Christian GD, Ruzicka J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Anal Chem* 1991 Nov; 63 (21): 2407-13.
- [10] Lenehan CE, Barnett NW, Lewis SW. Sequential injection analysis. *Analyst* 2002; 127 (8): 997-1020.
- [11] Christian GD. Sequential injection analysis for electrochemical measurements and process analysis *Analyst* 1994 Nov; 119 (11): 2309-14.
- [12] Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends Anal Chem* 2005 May; 24 (5): 416-25.

- [13] Marshall G, Wolcott D, Olson D. Zone fluidics in flow analysis: potentialities and applications. *Anal Chim Acta* 2003 Dec 4; 499 (1-2): 29-40.
- [14] Tutorial FIA / SIA. Disponível em <http://www.globalfia.com> [acedido em 31/01/2011].
- [15] Cladera A, Gomez E, Estela JM, Cerda V. Effect of variables influencing S-1/2 in sequential injection analysis. Extrapolability of S-1/2 based results between SIA designs. *Talanta* 1996 Oct; 43 (10): 1667-74.
- [16] McCormack TM, van Staden JF. Use of a sequential injection technique to evaluate the effect of mixing chambers on zone penetration. *Anal Chim Acta* 1998 Jul 3; 367 (1-3): 111-21.
- [17] van Staden JF, Marshall GD. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. *Process Contr Qual* 1992; 3: 251-61.
- [18] Dixon M, Webb EC. *Enzymes*. New York: Academic Press; 1979.
- [19] Skillen AW. Automation of enzyme assays. *J Clin Pathol* 1970; s1-4: 31-6
- [20] Economou A, Tzanavaras PD, Themelis DG. Sequential-injection analysis: A useful tool for clinical and biochemical analysis. *Curr Pharm Anal* 2007 Nov; 3 (4): 249-61.
- [21] Hansen EH. Flow-Injection Enzymatic Assays. *Anal Chim Acta* 1989 Jan 16; 216 (1-2): 257-73.
- [22] Guilbault GG. *Analytical uses of immobilized enzymes*. New York: Marcel Dekker; 1984.
- [23] Bisswanger H. *Practical Enzymology*. Germany: Wiley-VCH; 2004. p. 201-4.
- [24] Fatibello O, Vieira ID. Analytical use of vegetal tissue and crude extract as enzymatic source. *Quim Nova* 2002 May-Jun; 25 (3): 455-64.
- [25] Koncki R, Tymecki L, Rozum B. Enzymes in Flow Injection Analysis. In: Trojanowicz M, editor. *Advances in Flow Analysis*. Germany: Wiley-VCH; 2008. p. 395-423.
- [26] Min RW, Nielsen J, Villadsen J. On-line monitoring of glucose and penicillin by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 1996 Feb 29; 320 (2-3): 199-205.

- [27] Lapa RAS, Lima JLFC, Pinto IVOS. Development of a sequential injection analysis system for the simultaneous biosensing of glucose and ethanol in bioreactor fermentation. *Food Chem* 2003 May; 81 (1): 141-6.
- [28] Pena RM, Lima J, Lucia M, Saraiva MFS. Sequential injection analysis-based flow system for the enzymatic determination of aspartame. *Anal Chim Acta* 2004 Jun; 514 (1): 37-43.
- [29] Segundo MA, Rangel AOSS. Sequential injection flow system with improved sample throughput: determination of glycerol and ethanol in wines. *Anal Chim Acta* 2002 Apr 29; 458 (1): 131-8.
- [30] Araujo AN, Lima JLFC, Pinto PCAG, Saraiva MLMFS. Enzymatic Determination of Glucose in Milk Samples by Sequential Injection Analysis. *Anal Sci* 2009 May; 25 (5): 687-92.
- [31] Xu ZR, Fang ZL. Composite poly(dimethylsiloxane)/glass microfluidic system with an immobilized enzymatic particle-bed reactor and sequential sample injection for chemiluminescence determinations. *Anal Chim Acta* 2004 Apr 1; 507 (1): 129-35.
- [32] Haberkorn M, Hinsmann P, Lendl B. A mid-IR flow-through sensor for direct monitoring of enzyme catalysed reactions. Case study: measurement of carbohydrates in beer. *Analyst* 2002 Jan; 127 (1): 109-13.
- [33] Niculescu M, Erichsen T, Sukharev V, Kerenyi Z, Csoregi E, Schuhmann W. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation. *Anal Chim Acta* 2002 Jul 16; 463 (1): 39-51.
- [34] Gomes SP, Odlozilikova M, Almeida MG, Araujo AN, Couto CMCM, Montenegro MCBSM. Application of lactate amperometric sol-gel biosensor to sequential injection determination of L-lactate. *J Pharm Biomed Anal* 2007 Mar 12; 43 (4): 1376-81.
- [35] Gutes A, Ibanez AB, del Valle M, Cespedes F. Automated SIA e-tongue employing a voltammetric biosensor array for the simultaneous determination of glucose and ascorbic acid. *Electroanalysis* 2006 Jan; 18 (1): 82-8.
- [36] Min RW, Nielsen J, Villadsen J. Simultaneous Monitoring of Glucose, Lactic-Acid and Penicillin by Sequential Injection-Analysis. *Anal Chim Acta* 1995 Aug 30; 312 (2): 149-56.

- [37] Liu XZ, Hansen EH. Sequential injection determination of D-glucose by chemiluminescence using an open tubular immobilised enzyme reactor. *Anal Chim Acta* 1996 Jun 10; 326 (1-3): 1-12.
- [38] Rhee JI. Development of a sequential injection analysis system for monitoring of trehalose concentrations. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2007 May-Jun; 12 (3): 289-94.
- [39] Shu HC, Hakanson H, Mattiasson B. D-Lactic Acid in Pork as a Freshness Indicator Monitored by Immobilized D-Lactate Dehydrogenase Using Sequential Injection-Analysis. *Anal Chim Acta* 1993 Nov 26; 283 (2): 727-37.
- [40] Shu HC, Hakanson H, Mattiasson B. Online Monitoring of D-Lactic Acid during a Fermentation Process Using Immobilized D-Lactate Dehydrogenase in a Sequential Injection-Analysis System. *Anal Chim Acta* 1995 Jan 20; 300 (1-3): 277-85.
- [41] Alhadeff EM, Salgado AM, Cos O, Pereira N, Valdman B, Valero F. Enzymatic microreactors for the determination of ethanol by an automatic sequential injection analysis system. *Appl Biochem Biotechnol* 2007 Spr; 137: 17-25.
- [42] Passos MLC, Santos AM, Pereira AI, Santos JR, Santos AJC, Saraiva MLMFS, et al. Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous humor with a sequential injection system. *Talanta* 2009 Sep 15; 79 (4): 1094-9.
- [43] Bowers LD. Immobilized enzymes in chemical analysis *Trends Anal Chem* 1982; 1: 191-8.
- [44] Mottola HA. Enzymatic Preparations in Analytical Continuous-Flow Systems. *Anal Chim Acta* 1983; 145 (Jan): 27-39.
- [45] Hedenfalk M, Mattiasson B. Sequential injection analysis of ethanol using immobilized alcohol dehydrogenase. *Anal Lett* 1996; 29 (7): 1109-24.
- [46] Davidsson R, Genin F, Bengtsson M, Laurell T, Emneus J. Microfluidic biosensing systems - Part I. Development and optimisation of enzymatic chemiluminescent mu-biosensors based on silicon microchips. *Lab Chip* 2004; 4 (5): 481-7.
- [47] Sohn OJ, Kim CK, Rhee JI. Immobilization of Glucose Oxidase and Lactate Dehydrogenase onto Magnetic Nanoparticles for Bioprocess Monitoring System. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2008 Nov-Dec; 13 (6): 716-23.



- [48] Laiwattanapaisa W, Yakovleva J, Bengtsson M, Laurell T, Wiyakrutta S, Meevootisom V, et al. On-chip microfluidic systems for determination of L-glutamate based on enzymatic recycling of substrate. *Biomicrofluidics* 2009 Jan-Mar; 3 (1): 1-12.
- [49] Mei Y, Ran L, Ying X, Yuan Z, Xin S. A sequential injection analysis/chemiluminescent plant tissue-based biosensor system for the determination of diamine. *Biosens Bioelectron* 2007 Jan 15; 22 (6): 871-6.
- [50] Armenta S, Tomischko W, Lendl B. A Mid-Infrared Flow-Through Sensor for Label-Free Monitoring of Enzyme Inhibition. *Appl Spectrosc* 2008 Dec; 62 (12): 1322-5.
- [51] Kurzawa C, Hengstenberg A, Schuhmann W. Immobilization method for the preparation of biosensors based on pH shift-induced deposition of biomolecule-containing polymer films. *Anal Chem* 2002 Jan 15; 74 (2): 355-61.
- [52] Schuhmann W, Wohlschlager H, Huber J, Schmidt HL, Stadler H. Development of an Extremely Flexible Automatic Analyzer with Integrated Biosensors for Online Control of Fermentation Processes. *Anal Chim Acta* 1995 Oct 30; 315 (1-2): 113-22.
- [53] Stefan RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Amperometric biosensors/sequential injection analysis system for simultaneous determination of S- and R-captopril. *Biosens Bioelectron* 2000 Mar; 15 (1-2): 1-5.
- [54] Stefan RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. On-line assay of S-captopril using an amperometric biosensor/sequential injection system. *Anal Chim Acta* 2000 May 1; 411 (1-2): 51-6.
- [55] Stefan RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous detection of S and R captopril using sequential injection analysis. *Talanta* 2000 Apr 28; 51 (5): 969-75.
- [56] Stefan RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. On-line monitoring of R-captopril using an amperometric biosensor/sequential injection analysis system. *Instrum Sci Technol* 2002; 30 (3): 243-50.
- [57] Stefan RI, van Staden JF, Mulaudzi LV, Aboul-Enein HY. On-line simultaneous determination of S- and R-perindopril using amperometric biosensors as detectors in flow systems. *Anal Chim Acta* 2002 Sep 3; 467 (1-2): 189-95.
- [58] Stefan RI, Bokretson RG, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of L- and D-methotrexate using a sequential injection

analysis/amperometric biosensors system. *Biosens Bioelectron* 2003 Nov 30; 19 (3): 261-7.

[59] Stefan RI, Bokretson RG, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of L- and D-carnitine using a sequential injection analysis/amperometric biosensors system. *J Pharm Biomed Anal* 2003 Sep 19; 33 (2): 323-8.

[60] Stefan RI, Bokretson RG, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Biosensors for the determination of Ortho-acetyl-L-carnitine. Their utilization as detectors in a sequential injection analysis system. *Prep Biochem Biotechnol* 2003; 33 (3): 163-72.

[61] Stefan RI, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous determination of L-thyroxine (L-T-4), D-thyroxine (D-T-4), and L-triiodothyronine (L-T-3) using a sensors/sequential injection analysis system. *Talanta* 2004 Sep 8; 64 (1): 151-5.

[62] Stefan RI, van Staden JF, Bala C, Aboul-Enein HY. On-line assay of the S-enantiomers of enalapril, ramipril and pentopril using a sequential injection analysis/amperometric biosensor system. *J Pharm Biomed Anal* 2004 Nov 19; 36 (4): 889-92.

[63] Stefan-van Staden RI, Bokretson RG, van Staden JF, Aboul-Enein HY. Simultaneous detection of creatine and creatinine using a sequential injection analysis/biosensor system. *Prep Biochem Biotechnol* 2006; 36 (4): 287-96.

[64] Mayer M, Ruzicka J. Flow injection based renewable electrochemical sensor system. *Anal Chem* 1996 Nov 1; 68 (21): 3808-14.

[65] Lindfors T, Lahdesmaki I, Ivaska A. A jet ring cell with a renewable solid support for amperometric detection of glucose in a sequential injection analysis system. *Anal Lett* 1996; 29 (13): 2257-67.

[66] Segundo MA, Rangel AOSS. Kinetic determination of L(-)-malic acid in wines using sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2003 Dec 4; 499 (1-2): 99-106.

[67] Silvestre CIC, Segundo MA, Saraiva M, Lima J. Indirect Sequential Injection Enzymatic Determination of Allopurinol in Pharmaceuticals Based on Xanthine Oxidase Inhibition. *Spectrosc Lett* 2009; 42 (6-7): 341-50.

- [68] Pinto PCAG, Lima JLFC, Saraiva MLMFD. Sequential injection analysis of nitrites and nitrates in human serum using nitrate reductase. *Clin Chim Acta* 2003 Nov; 337 (1-2): 69-76.
- [69] Pinto PCAG, Lima JLFC, Saraiva MLMFS. An enzymatic flow analysis methodology for the determination of nitrates and nitrites in waters. *Int J Environ Anal Chem* 2005 Jan 15; 85 (1): 29-40.
- [70] Silva FV, Nogueira ARA, Souza GB, Reis BF, Araujo AN, Montenegro MCMBS, et al. Potentiometric determination of urea by sequential injection using Jack bean meal crude extract as a source of urease. *Talanta* 2000 Nov 1; 53 (2): 331-6.
- [71] Chung SC, Christian GD, Ruzicka J. Sequential injection methodology for fermentation monitoring. *Process Contr Qual* 1992; 3: 115-25.
- [72] Chen Y, Ruzicka J. Accelerated micro-sequential injection in lab-on-valve format, applied to enzymatic assays. *Analyst* 2004; 129 (7): 597-601.
- [73] Araujo AN, Lima JLFC, Saraiva MLMFS, Zagatto EAG. A new approach to dialysis in sequential injection systems: Spectrophotometric determination of L(+)-lactate in wines. *Am J Enol Vitic* 1997; 48 (4): 428-32.
- [74] Surribas A, Cos O, Montesinos JL, Valero F. On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnol Lett* 2003 Nov; 25 (21): 1795-800.
- [75] Wu CH, Scampavia L, Ruzicka J, Zamost B. Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system. *Analyst* 2001; 126 (3): 291-7.
- [76] Simonet BM, Grases M, March JG. Enzymatic determination of pyrophosphate in urine by flow methods. *Anal Sci* 2003 Jul; 19 (7): 1029-32.
- [77] Samanta G, Zhang SM, Dasgupta P. An automated sequential injection analysis system for the determination of trace endotoxin levels in water. *PDA J Pharm Sci Technol* 2003 Jan-Feb; 57 (1): 12-24.
- [78] Oliveira HM, Segundo MA, Lima JLFC, Grassi V, Zagatto EAG. Kinetic enzymatic determination of glycerol in wine and beer using a sequential injection system with spectrophotometric detection. *J Agric Food Chem* 2006 Jun 14; 54 (12): 4136-40.

- [79] Dominguez K, Toth IV, Souto MRS, Mendes F, De Maria CG, Vasconcelos I, et al. Sequential Injection Kinetic Flow Assay for Monitoring Glycerol in a Sugar Fermentation Process by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* 2010 Mar; 160 (6): 1664-73.
- [80] Pascoa RNMJ, Vidigal SSMP, Toth IV, Rangel AOSS. Sequential injection system for the enzymatic determination of ethanol in wine. *J Agric Food Chem* 2006 Jan 11; 54 (1): 19-23.
- [81] Vidigal SSMP, Toth IV, Rangel AOSS. Sequential injection-LOV format for peak height and kinetic measurement modes in the spectrophotometric enzymatic determination of ethanol: Application to different alcoholic beverages. *Talanta* 2008 Dec 15; 77 (2): 494-9.
- [82] Vidigal SSMP, Toth IV, Rangel AOSS. Sequential injection lab-on-valve system for the on-line monitoring of hydrogen peroxide in lens care solutions. *Microchem J* 2009 Mar; 91 (2): 197-201.
- [83] Panoutsou P, Economou A. Rapid enzymatic chemiluminescent assay of glucose by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection method. *Talanta* 2005 Sep 15; 67 (3): 603-9.
- [84] Economou A, Panoutsou P, Themelis DG. Enzymatic chemiluminescent assay of glucose by sequential-injection analysis with soluble enzyme and on-line sample dilution. *Anal Chim Acta* 2006 Jul 14; 572 (1): 140-7.
- [85] Lima MJR, Fernandes SMV, Rangel AOSS. Enzymatic determination of urea in milk by sequential injection with spectrophotometric and conductometric detection. *J Agric Food Chem* 2004 Nov 17; 52 (23): 6887-90.
- [86] Silva FV, Souza GB, Nogueira ARA. Use of yeast crude extract for sequential injection determination of carbohydrates. *Anal Lett* 2001; 34 (8): 1377-88.
- [87] Pu QS, Liu SR. Microfabricated electroosmotic pump for capillary-based sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2004 May 24; 511 (1): 105-12.
- [88] Pinto PCAG, Saraiva MLMFS, Reis S, Lima JLFC. Automatic sequential determination of the hydrogen peroxide scavenging activity and evaluation of the antioxidant potential by the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical

cation assay in wines by sequential injection analysis. *Anal Chim Acta* 2005 Feb 21; 531 (1): 25-32.

[89] Ruzicka J, Gubeli T. Principles of Stopped-Flow Sequential Injection-Analysis and Its Application to the Kinetic Determination of Traces of a Proteolytic-Enzyme. *Anal Chem* 1991 Sep 1; 63 (17): 1680-5.

[90] Hansen EH, Willumsen B, Winther SK, Drabol H. Multistep Determination of Enzyme-Activity by Flow-Injection and Sequential Injection-Analysis - Assay of Amyloglucosidase. *Talanta* 1994 Nov; 41 (11): 1881-93.

[91] Schindler R, Thanh HL, Lendl B, Kellner R. Determination of enzyme kinetics and chemometric evaluation of reaction products by FTIR spectroscopy on the example of beta-fructofuranosidase. *Vib Spectrosc* 1998 May; 16 (2): 127-35.

[92] Schindler R, Lendl B. Simultaneous determination of enzyme activities by FTIR-spectroscopy in an one-step assay. *Anal Chim Acta* 1999 May 26; 391 (1): 19-28.

[93] Min RW, Carlsen M, Nielsen J, Villadsen J. Measurement of Alpha-Amylase Activity by Sequential Injection-Analysis. *Biotechnol Tech* 1995 Oct; 9 (10): 763-6.

[94] Chen Y, Carroll AD, Scampavia L, Ruzicka J. Automated method, based on micro-sequential injection, for the study of enzyme kinetics and inhibition. *Anal Sci* 2006 Jan; 22 (1): 9-14.

[95] Lopez-Sanchez M, Ayora-Canada MJ, Molina-Diaz A, Siam M, Huber W, Quintas G, et al. Determination of enzyme activity inhibition by FTIR spectroscopy on the example of fructose biphosphatase. *Anal Bioanal Chem* 2009 Aug; 394 (8): 2137-44.

[96] Vidigal SSMP, Toth IV, Rangel AOSS. Sequential Injection Lab-on-Valve System for the Determination of the Activity of Peroxidase in Vegetables. *J Agric Food Chem* 2010 Feb 24; 58 (4): 2071-5.

[97] Pinto PCAG, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. Sequential injection analysis as a tool for implementation of enzymatic assays in ionic liquids. *Talanta* 2008 Dec 15; 77 (2): 479-83.

[98] Passos MLC, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. Enzymatic oxidation in aqueous and micellar media based on horseradish peroxidase-hydrogen peroxide system using a SIA manifold. *Talanta* 2008 Dec 15; 77 (2): 484-9.



## CAPÍTULO 2

---

Parte experimental





## 2.1. Introdução

Neste capítulo são descritos os aspectos experimentais gerais, comuns aos diversos trabalhos realizados, evitando assim repetições subsequentes nas secções experimentais incluídas em cada trabalho. São assim referidos os equipamentos e material utilizados no decurso dos capítulos bem como os procedimentos gerais usados na preparação dos reagentes. São ainda apresentados o procedimento de optimização seguido no desenvolvimento das metodologias propostas e o tratamento estatístico empregue para avaliação da qualidade dos resultados obtidos. É, também, abordado o modo de controlo dos sistemas analíticos desenvolvidos.

## 2.2. Reagentes e soluções

A preparação das soluções foi realizada com água ultra-pura, obtida através de um sistema de purificação Millipore RG munido de um conjunto de resinas de leito misto QPack2 – CPMQ004D2 e de um filtro de partículas 0,45  $\mu\text{m}$  Millipak 40 Gamma gold. Este sistema de purificação permite obter uma água com uma resistividade superior a 18 M $\Omega$  cm. Todos os reagentes usados eram de qualidade analítica ou equivalente, não tendo sido realizado qualquer tratamento de purificação adicional.

As soluções padrão concentradas eram obtidas por pesagem rigorosa do respectivo reagente sólido em balança analítica e dissolução, em solvente apropriado, em material de vidro classe A ou equivalente, convenientemente lavado. As soluções padrão de trabalho eram obtidas por diluição rigorosa da solução mãe usando pipetas automáticas Gilson modelos P20, P100, P1000 e P5000 de volume variável e com capacidades máximas de 20, 100, 1000 e 5000  $\mu\text{L}$ , respectivamente, com pontas de plástico descartáveis. As pipetas automáticas eram regularmente calibradas com água. No caso de reagentes líquidos, a preparação das soluções mais concentradas era realizada por diluição directa a partir do reagente. As soluções mais diluídas eram obtidas por diluições rigorosas da solução mais concentrada.

Na secção de material e métodos de cada um dos seguintes capítulos (3 a 7) irão descrever-se todos os reagentes utilizados ao longo dos trabalhos realizados e os cuidados obedecidos na preparação das soluções quando justificável.

## 2.3. Instrumentação

Neste ponto descrevem-se os equipamentos que foram utilizados no decorrer do trabalho experimental que deu origem a esta dissertação. São referidos quer os equipamentos empregues nos sistemas de fluxo desenvolvidos, quer os utilizados nos diferentes procedimentos de comparação.

### 2.3.1. Equipamento Auxiliar

De acordo com a precisão necessária, todos os reagentes e amostras foram pesados numa balança analítica Mettler Toledo AG285 (precisão de  $2 \times 10^{-5}$  g) ou numa balança Kern 440-35N (precisão de  $1 \times 10^{-2}$  g).

Para a agitação das soluções foi utilizada uma placa de aquecimento e agitação da Falc - F60.

Quando necessário, o pH foi ajustado utilizando um milivoltímetro de alta impedância de entrada da marca Crison Instruments modelo GLP 22 acoplado a um eléctrodo de vidro combinado de Ag/AgCl da mesma marca e modelo 52-02. A calibração do eléctrodo combinado era realizada com os padrões comerciais pH = 4,00 (Riedel-deHaën, 33543), pH = 7,00 (Riedel-deHaën, 33546) e pH = 9,00 (Merck, 9889).

Para o desarejamento das soluções, quando necessário, foi utilizado um banho de ultra-sons da VWR USC 100T5.

Para o estabelecimento e manutenção da temperatura na determinação da glutathione (Capítulo 3) e no estudo da cinética da reacção catalisada pela tirosinase em líquido iónico (Capítulo 6) foi utilizado um banho termostaticado GLF Thermoed, modelo 5001.

Para o processamento das amostras de sangue, no Capítulo 3, foram utilizados um vórtice da marca Unimag Zx (UniEquip) e uma centrífuga da marca Jouan BR4i Thermo Electron Corporation.

Todas as medidas espectrofotométricas preconizadas pelos procedimentos de comparação para os parâmetros estudados foram efectuadas num espectrofotómetro UV/VIS Perkin Elmer  $\lambda$ 50 usando células de quartzo com 1 cm de passo óptico (Hellma, ref. 6030-UV), num espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B usando células de quartzo com o mesmo passo óptico (Hellma, ref.104-QS), bem como no leitor de microplacas Synergy HT, BIO-TEK. Para a realização do método de referência da determinação do metanol em amostras de biodiesel [1] foi utilizado um cromatógrafo de gás ThermoFinnigan Trace (Milan, Italy) equipado com um injector do tipo com/sem divisão do fluxo (em inglês, "split-splitless injector"), associado a um detector de ionização em

chama (FID, do acrónimo em inglês “Flame Ionization Detector”). Para a separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar de sílica fundida (Equity<sup>®</sup>, Supelco) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 5 µm de espessura da fase estacionária.

As montagens de fluxo desenvolvidas incorporaram como sistema de detecção:

- espectrofotómetro de visível, da marca Jenway (modelo 6300), equipado com uma célula de fluxo de 80 µL da marca Hellma, com a referência 178.710 QS no Capítulo 3 e com uma célula de fluxo de 18 µL da mesma marca com a referência 178.712 QS no Capítulo 4;
- espectrofotómetro de UV/VIS da marca Heλios γ equipados com um suporte de células termostaticado e uma célula de fluxo de 80 µL da marca Hellma, com a referência 178.710 QS, usado no trabalho descrito no Capítulo 6;
- fluorímetro da marca Jasco, modelo FP-2020, equipado com uma célula de fluxo de 16 µL no Capítulo 5;
- luminómetro equipado com uma célula de construção laboratorial em forma de espiral (4 cm de comprimento, 0,14 cm de largura, 0,09 cm de profundidade, 50 µL de volume interno, 0,9 cm de diâmetro da espiral e 0,8 cm<sup>2</sup> de área de superfície efectiva de emissão de luz), fabricada em polimetilmetacrilato, colocada em frente de um fotomultiplicador (Hamamatsu City, Japan, modelo H5784), que apresenta uma zona de resposta para comprimentos de onda no intervalo de 195 a 850 nm, utilizado no trabalho descrito no Capítulo 7. A célula de fluxo bem como o módulo fotossensor eram acomodados numa caixa plástica negra para proteger o sistema de detecção da luz externa. Outro componente fundamental é o circuito de realimentação que permite controlar o ganho do fotomultiplicador por intermédio de um potenciómetro externo de 10 kΩ, cuja posição regula a voltagem de realimentação que pode variar entre 0,3 V (Ganho = 1) e 0,8 V (Ganho = 1000).

### 2.3.2. Sistemas de fluxo

Descrevem-se em seguida algumas características do equipamento/material utilizado na montagem dos sistemas de fluxo.

#### 2.3.2.1. Unidades de aspiração/propulsão

Os sistemas de aspiração/propulsão utilizados foram de dois tipos:

- a) Bomba peristáltica, Minipuls 3 da Gilson de 4 canais [2]. O caudal das soluções aspiradas/bombeadas depende da velocidade de rotação seleccionada e, igualmente, do

diâmetro interno do tubo de impulsão utilizado. Os tubos de impulsão eram de cloreto de polivinilo (PVC, do acrónimo em inglês “Polyvinyl chloride”), de 1,02 ou 1,30 mm de diâmetro interno ou de fluorelastómero (para solventes orgânicos, Capítulo 4) de 1 mm de diâmetro interno, da mesma marca. A escolha do diâmetro interno do tubo de impulsão era efectuada tendo em conta o caudal de propulsão pretendido e os volumes de solução a aspirar. Os tubos eram substituídos logo que se detectavam sinais de mau funcionamento tais como alterações do caudal, perda de elasticidade ou aumento do número de pulsos.

A calibração dos tubos de impulsão era efectuada por cálculo da variação de volume aspirado ou impulsionado, por pesagem [3]. A diferença obtida após pesagem de um goblé com água, previamente tarado, sujeito a aspirações ou propulsões a partir da válvula selectora, permitia estabelecer uma relação entre tempo e caudal, que permitia a definição dos volumes, a aspirar ou propulsionar, em termos de tempo. Este procedimento foi realizado sempre que necessário. O funcionamento da bomba peristáltica era controlado por computador, em termos de sentido e velocidade da rotação, posição de paragem da cabeça rotativa, início e paragem de funcionamento.

No Capítulo 3, na determinação da glutathione em amostras de sangue, a bomba apresentava um dispositivo de contacto que controlava a sua paragem numa posição predefinida, através de um íman fixado na cabeça rotativa da bomba peristáltica e de um “reed relay” numa zona exterior à cabeça da bomba [4]. Aquando da sua aproximação, havia passagem de corrente eléctrica e consequente activação da válvula solenóide de três 3 vias, colocada entre a bomba e o tubo de armazenamento. Desta forma, o controlo do início do movimento da bomba peristáltica a partir da mesma posição assegurava reprodutibilidade dos volumes aspirados e propulsionados.

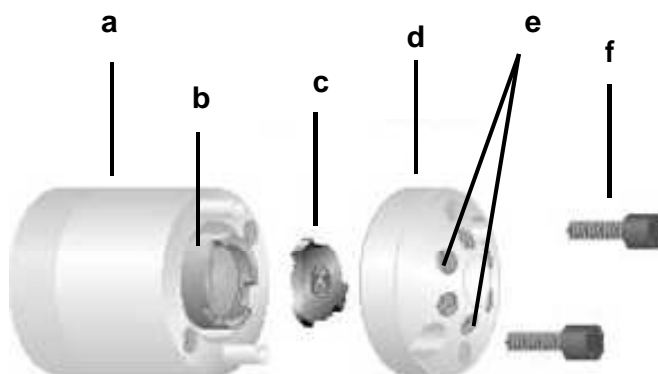
No sistema referente ao trabalho do Capítulo 4 foi incorporada uma bomba peristáltica adicional através da qual se fazia o carregamento da alça de amostragem da válvula de injeção, com amostra.

b) Multisseringa BU4S, Crison Instruments, com quatro seringas (Microliter, Hamilton) com capacidades de 10,00; 5,00 e 1,00 mL, usada no Capítulo 7. As seringas são de vidro e incluem êmbolos e ligadores em politetrafluoroetileno (PTFE). Trata-se de uma bomba de pistão multi-canal que permite a movimentação simultânea dos êmbolos das quatro seringas, que estão ligadas a uma barra movimentada pelo motor de uma bureta automática, controlado a partir de um computador através de uma porta série. O movimento completo do êmbolo da seringa corresponde a 5000 passos, sendo que o volume correspondente a cada passo é dependente da seringa utilizada. O caudal de aspiração/bombeamento é definido pelo volume da seringa adoptada e pela velocidade a que o êmbolo é movido. Junto à saída de cada seringa está acoplada uma válvula

solenóide de três vias, enquanto que na extremidade oposta se encontra o êmbolo responsável pelos movimentos de aspiração/propulsão das soluções. Estas válvulas determinam a ligação das seringas à restante montagem analítica ou ao reservatório das soluções, consoante se encontram na posição “On” ou “Off”, respectivamente, independentemente do sentido do movimento assumido pelo êmbolo (aspiração ou propulsão) [5].

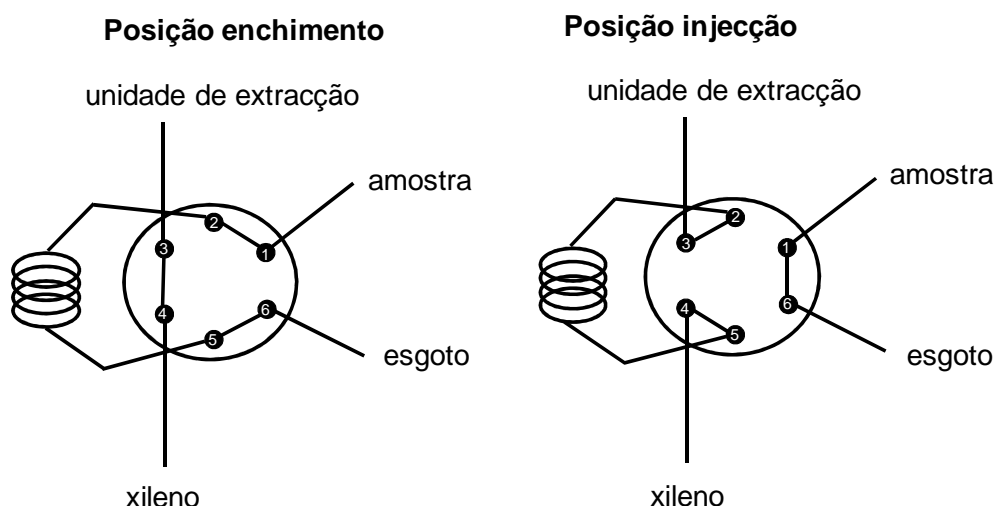
### 2.3.2.2. Dispositivos de selecção de fluidos

Como dispositivo selector de fluidos foi utilizada uma válvula selectora de 10 portas da marca Vici modelo C25-3180D (Valco Instruments, Houston, TX, EUA) (Figura 2.1.). Esta válvula apresenta um canal central que a cada momento pode estar conectado com um dos 10 canais laterais, permitindo o direccionamento dos fluidos.



**Figura 2.1.** Representação esquemática dos componentes de uma válvula selectora da Valco Instruments: a) corpo da válvula; b) accionador; c) rotor; d) estator; e) orifícios de ligação das portas da válvula; f) parafusos de fixação da cabeça da válvula. Adaptado de [6].

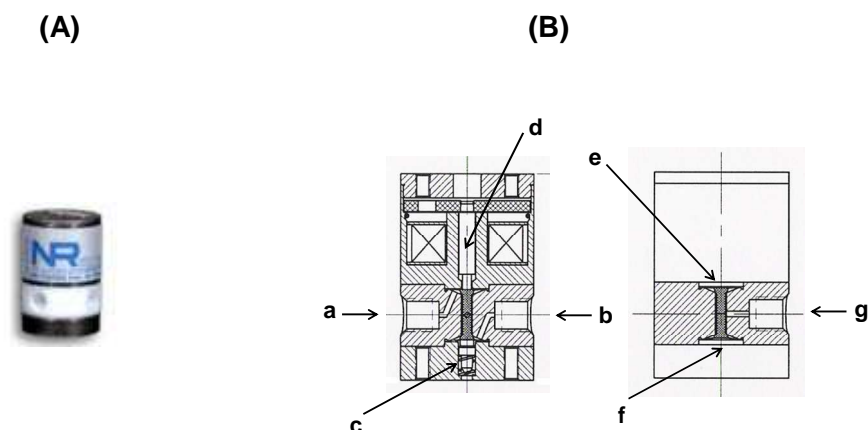
A montagem, apresentada no Capítulo 4, utilizou um equipamento Crison que incorporava uma válvula selectora de 8 portas, semelhante à descrita para as restantes montagens, e uma válvula de injeção de 6 portas. A válvula de injeção incorporava, entre as portas 2 e 5, uma alça de amostragem constituída por uma porção de tubo de teflon de 0,8 mm de diâmetro interno, com 20 cm de comprimento. Esta válvula tem duas posições possíveis, uma que permitia o enchimento da alça com amostra (Posição de enchimento) e outra em que ocorria a passagem do xileno pela alça, empurrando a amostra em direcção à unidade de extracção (Posição de injeção) (Figura 2.2.).



**Figura 2.2.** Representação esquemática das posições da válvula de injeção do equipamento Crison utilizado no Capítulo 4.

No Capítulo 7, foi também usada uma válvula selectora de 8 portas da marca Crison.

Foram também utilizadas como dispositivos de selecção de fluidos válvulas solenóides de três vias (uma entrada/duas saídas) NResearch P/N 161T031 [7] nos Capítulos 3 e 4. Estas válvulas são activadas electromecanicamente por solenóide. O seu funcionamento é condicionado pela direcção da pressão exercida sobre uma membrana em teflon, que define o percurso das soluções: o accionamento do núcleo do solenóide empurra a membrana de PTFE, estabelecendo um dos percursos; após o desligar da válvula, uma mola helicoidal recoloca a membrana de PTFE na sua posição inicial estabelecendo o percurso alternativo (Figura 2.3.). As válvulas possuem um volume interno de cerca de 27  $\mu\text{L}$ , um tempo de actuação inferior a 30 ms e todo o material da válvula que fica em contacto com a solução é de PTFE. No Capítulo 3 foi utilizada uma válvula solenóide de três vias ligada à bomba peristáltica, como interruptor do escoamento entre a bomba e o tubo de armazenamento, conforme descrito na secção anterior. No Capítulo 4, também foi acoplada uma válvula solenóide de três vias, com o objectivo de coordenar o canal do reagente (ABTS+POD) e o canal do transportador ligados à bomba peristáltica, de forma a inserir um volume definido de reagente cromogénico e de peroxidase no tubo de reacção aquando da sua activação. De outro modo, esta solução fluía em circuito fechado até posterior activação da válvula.



**Figura 2.3.** (A) Válvula solenóide de 3 vias; (B) Representação esquemática do seu interior: **a,b** – canais de entrada; **c** – mola; **d** – solenóide; **e,f** – membranas de PTFE; **g** – canal de saída. Adaptado de [7].

### 2.3.2.3. Tubagem e outros componentes das montagens

A tubagem utilizada para a interligação entre os diferentes módulos constituintes de cada sistema de fluxo foi de PTFE (Omnifit), com 0,8 mm de diâmetro interno e 1,6 mm de diâmetro externo [8]. Todos os tubos de armazenamento e reactores utilizados foram construídos com PTFE tendo sido adoptada uma configuração em figuras de oito, por enrolamento dessa forma ao longo de uma malha de plástico de 2 cm, com o objectivo de intensificar o transporte radial e diminuir o transporte laminar das soluções ao longo do percurso [9]. O comprimento dos tubos de armazenamentos utilizados asseguravam uma dispersão mínima e ao mesmo tempo possuíam volume suficiente para garantir que as soluções aspiradas não atingissem a unidade de aspiração/propulsão. A tubagem utilizada na bomba peristáltica foi de PVC ou de fluorelastómero, sendo substituída sempre que apresentava sinais de desgaste.

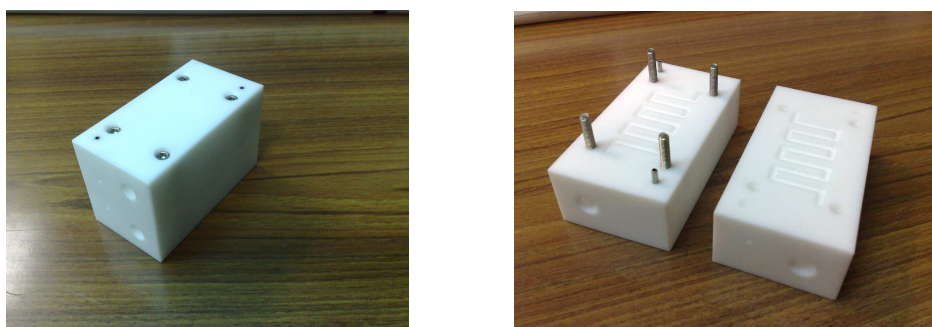
As confluências utilizadas eram de construção laboratorial e fabricadas em Perspex® com uma configuração similar aos modelos de construção apresentados por Alegret et al. [10]. Foram utilizadas confluências com configurações em “duplo-T”, “Y” e “T”, que permitiam que os líquidos confluíssem em diferentes ângulos.

Foram ainda construídos diferentes dispositivos cujas potencialidades são avaliadas em cada determinação.

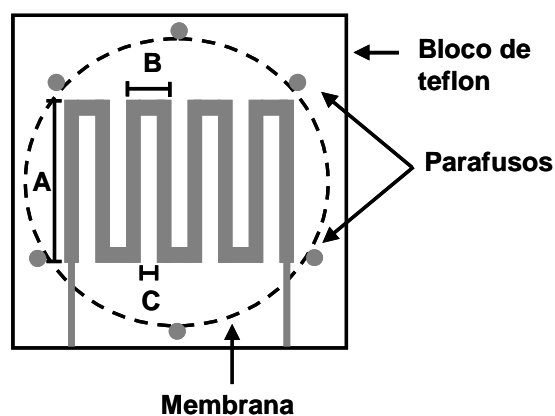
No trabalho que se apresenta no Capítulo 4, da determinação do metanol em amostras de biodiesel, foi usada uma unidade de extracção para permitir a passagem do metanol da amostra orgânica, solução dadora, para a solução tampão aceitadora. Este

componente feito de PTFE, com um volume interno de cerca de 160  $\mu\text{L}$ , era constituído por dois paralelepípedos que apresentavam uma cavidade com configuração em “U” (2,0 mm de largura e 0,5 mm de profundidade) (Figura 2.4. A e B). A membrana hidrofílica de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do acrónimo em inglês “polyvinylidene fluoride”; Millipore Durapore®, Ref. SVLP09050), com diâmetro de poro de 5  $\mu\text{m}$  e espessura de 125  $\mu\text{m}$ , era colocada entre as duas cavidades justapostas face a face e o seu aperto era conseguido por intermédio de quatro parafusos. A ligação das cavidades com o exterior fazia-se por canais com 0,8 mm de diâmetro interno.

(A)



(B)



**Figura 2.4.** (A) Fotografia da unidade de extracção; (B) Representação esquemática da vista de topo da cavidade da referida unidade: dimensões  $A = 25 \text{ mm}$ ,  $B = 10 \text{ mm}$ ,  $C = 4 \text{ mm}$  e profundidade do canal = 0,5 mm.



Neste módulo analítico, foi também utilizada uma coluna como reactor enzimático (Figura 2.5.), de construção laboratorial, fabricada em Perspex®, com 20 mm de comprimento, que apresentava cavidade tubular com 1,5 mm de diâmetro interno. Em cada uma das extremidades das colunas era colocado um disco de filtro, da marca MoBiTec (Goettingen, Germany), com poros de 35  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Ambas as extremidades da coluna possuíam um rosqueamento que permitia a ligação ao sistema de fluxo através de um ligador convencional.



**Figura 2.5.** Fotografia do reactor enzimático.

Foi, neste sentido, também avaliada uma câmara de agitação cilíndrica (Figura 2.6.) (volume interno de 400  $\mu\text{L}$ ; raio da base igual a 4 mm e altura igual a 8 mm), colocada sobre um agitador magnético que promovia a rotação de uma barra magnética (comprimento de 6 mm e largura de 3mm) colocada no seu interior, como alternativa aos reactores descritos anteriormente para estudar a influência do empacotamento das esferas de vidro com enzima imobilizada.



**Figura 2.6.** Fotografia da câmara de agitação magnética.

Para a avaliação da actividade da fosfolípase  $A_2$  sobre os lipossomas (Capítulo 5) foram usadas duas câmaras de mistura de Perspex® (Figura 2.7.), com agitação mecânica, de volume interno regulável, através do ajuste da posição de uma peça móvel no topo das mesmas. Eram constituídas por uma cavidade cilíndrica, perfurada na base em dois pontos diametralmente opostos, bem como no centro da peça móvel formando um canal para o exterior das câmaras. Estas eram também colocadas sobre um agitador magnético que promovia a rotação de uma barra magnética (comprimento de 6 mm e largura de 3mm) colocada no seu interior. Nesta montagem, um dos canais da base das câmaras foi obstruído com um ligador e como tal o líquido entrava pelo outro canal lateral emergindo pelo canal situado no topo das mesmas (Figura 2.7.).



**Figura 2.7.** Fotografia da câmara de mistura.

#### **2.3.2.4. Registo e aquisição do sinal analítico**

Nos trabalhos descritos nos Capítulos 3, 4, 5 e 6 a aquisição do sinal analítico foi assegurada por um registador da marca Linseis (modelo L250 E) acoplado às unidades detectoras anteriormente referidas e através de software desenvolvido em QuickBasic 4.5 [11]. No trabalho descrito no Capítulo 7 a aquisição foi efectuada por meio do programa Autoanalysis 5.0 (Sciware, Palmanyola, Espanha) através de livrarias de ligação dinâmicas (DLLs, do inglês “Dynamic Link Libraries”) [12].

### 2.3.2.5. Controlo informático dos sistemas

Os dispositivos selectores de fluidos (válvulas solenóides, válvula selectora, válvula de injeção) e os dispositivos de aspiração/propulsão (bomba peristáltica) encontravam-se interligados, através de um computador Pentium I, por uma interface activa da marca Advantech PCL-711B.

O controlo da posição da válvula selectora de 10 portas era efectuado por desactivação, em combinações predefinidas de 6 saídas digitais de 5 V. A bomba peristáltica era, por seu lado, controlada por apenas duas saídas digitais da mesma voltagem, que definiam a activação e sentido de rotação da bomba. A velocidade de rotação da bomba era controlada por uma saída analógica de modo que os sinais enviados pelo computador variavam entre 0 e 5 V, correspondendo às velocidades de rotação mínima (0 rotações por minuto) e máxima (48 rotações por minuto). Dado que o funcionamento das válvulas solenóides de três vias requer uma tensão de 12 V foi colocado, entre cada válvula e a placa de controlo, um interruptor electrónico de alimentação que era accionado por intermédio da activação de uma saída digital da placa [13].

As metodologias baseadas na técnica SIA assentavam na actuação automática e sincronizada do dispositivo de aspiração/propulsão e dos dispositivos selectores de fluidos. Os programas usados nos vários métodos apresentados eram escritos em Microsoft QuickBasic 4.5 (implementada em ambiente DOS) e foram adaptados aos elementos utilizados em cada situação. De um modo geral, cada programa permitia definir a sequência de etapas para cada determinação, bem como a sua repetição programada quando necessário. Em cada caso particular as instruções dadas referiam-se à posição da válvula selectora a aceder, ao tempo de permanência na posição definida, ao sentido de funcionamento das unidades de aspiração/propulsão e ainda à posição da válvula solenóide nos casos em que foi utilizada.

No trabalho descrito no Capítulo 7, o controlo do equipamento englobado na montagem foi efectuado a partir de um computador, através da porta de comunicação RS 232. O software utilizado foi o Autoanalysis, permitindo um controlo, por parte do utilizador, dos dispositivos (sentido e velocidade de deslocamento do pistão da multisseringa e posição das válvulas solenóides e válvula selectora de fluidos), assim como a aquisição do sinal analítico.

## 2.4. Estudo das variáveis e avaliação das características de funcionamento dos métodos desenvolvidos

A selecção dos valores mais adequados para as variáveis em estudo em cada montagem foi efectuada pelo método univariante, que consiste em variar, num determinado intervalo, o parâmetro a estudar, sendo os restantes mantidos fixos. A optimização dos diferentes parâmetros do sistema foi efectuada tendo em conta diversos factores que afectam o desempenho da montagem analítica, nomeadamente a sensibilidade, o ritmo de amostragem, o limite de detecção, a precisão, a exactidão bem como o consumo de amostra e reagentes.

O intervalo de concentrações em que se verificava uma relação linear entre a concentração da espécie e o valor médio do sinal analítico do detector era definido através do traçado de curvas de calibração, com soluções de concentração crescente da espécie a determinar. A concentração das amostras foi obtida por interpolação nas curvas de calibração, previamente estabelecidas, do sinal analítico obtido na análise de cada amostra.

A precisão da metodologia era avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD, do acrónimo em inglês “Relative Standard Deviation”), expresso em percentagem. Amostras, com diferentes concentrações da espécie a determinar, eram injectadas 10 vezes consecutivas, no sistema de fluxo, sendo calculada a concentração média obtida e o respectivo desvio padrão, de forma a avaliar a repetibilidade da metodologia, ao longo de todo o intervalo de concentração linear.

A avaliação da exactidão das metodologias propostas foi efectuada por comparação com os respectivos métodos de referência ou de comparação.

O limite de detecção de uma operação analítica foi definido como o valor mínimo de concentração ( $C_{LD}$ ) para o qual se consegue obter uma resposta analítica ( $Y_{LD}$ ) significativamente diferente do valor de um branco ou do ruído de fundo [14]. Desta forma,  $Y_{LD}$  pode ser obtido de duas formas: a) a partir da equação:  $Y_{LD} = b + 3 S_{y/x}$ , em que  $b$  corresponde à ordenada na origem e  $S_{y/x}$  representa o desvio padrão dos valores

de  $y$  numa regressão linear, calculado por  $\sqrt{\frac{\sum (y - \bar{y})^2}{n - 2}}$ , em que  $C_{LD} = \frac{(Y_{LD} - b)}{a}$ , sendo

$a$  o declive da recta de regressão linear; b) através da equação  $Y_{LD} = Y_B + 3 S_B$ , onde  $Y_B$  corresponde à média de dez medições do sinal analítico do branco e  $S_B$  ao desvio padrão dessas mesmas medições. As medições do branco foram efectuadas pela injeção no sistema de uma solução com a mesma composição das soluções padrão com excepção

do analito a determinar. A concentração mínima detectável ( $C_{LD}$ ) era calculada por interpolação na curva de calibração do valor de  $Y_{LD}$  [15].

O limite de quantificação (também designado por limite de determinação), definido como o valor mínimo de concentração ( $C_{LQ}$ ) para o qual se consegue obter uma resposta quantitativa e precisa ( $Y_{LQ}$ ), pode ser obtido após o cálculo do  $Y_{LQ}$  através das equações:  $Y_{LQ} = b + 10 S_{y/x}$  ou  $Y_{LQ} = Y_B + 10 S_B$  [15].

No trabalho descrito no Capítulo 4, foi também calculado o limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) do método analítico de acordo com as normas ISO 11843-2 [16]. O  $CC\alpha$  corresponde à concentração acima da qual pode ser decidido se a medida é realmente maior que o limite de resíduo máximo (MRL, do acrónimo em inglês “Maximum Residue Limit”) para um nível de confiança de 95%. Por seu lado, o  $CC\beta$  é definido como a concentração a partir da qual o método permite a quantificação do analito para um nível de confiança de 95%.

O ritmo de determinação, expresso como o número de determinações por hora, foi definido com base no período de tempo resultante da soma do tempo necessário à execução de cada etapa do ciclo analítico, acrescido do tempo necessário para a comunicação de instruções entre o computador e os restantes dispositivos do sistema.

## 2.5. Tratamento estatístico dos resultados

Os valores dos parâmetros a determinar eram obtidos a partir da avaliação da intensidade dos sinais analíticos registados na análise das amostras, sendo esta calculada a partir de um conjunto de 3 medidas consecutivas da mesma amostra. O valor final do parâmetro a determinar era calculado por interpolação da intensidade de sinal obtido, na curva de calibração estabelecida para cada metodologia.

A exactidão de cada metodologia era avaliada por comparação dos resultados obtidos com os fornecidos pelo método de referência aplicável ou por outro convencional bem estabelecido. Em todos os capítulos, aos resultados da análise pelos métodos propostos e de comparação encontra-se sempre associado o desvio padrão de 3 determinações (Resultado  $\pm$  Desvio Padrão). Para cada determinação calcularam-se os desvios relativos para cada par de resultados obtidos (DR, %) com base na

$$\text{expressão: } DR\% = \frac{(C_{\text{Método proposto}} - C_{\text{Método referência}})}{C_{\text{Método referência}}} \times 100.$$

Nas metodologias referentes aos Capítulos 3, 4 e 7, os resultados foram comparados através de uma regressão linear do tipo  $C_{\text{Método proposto}} = C_0 + S \times C_{\text{Método referência}}$ . A eventual concordância entre os dois métodos era avaliada a partir do valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) e dos intervalos de confiança, para um nível de significância de 95%, para a ordenada da origem ( $C_0$ ) e para o declive ( $S$ ), indicados entre parêntesis [17]. Desejavelmente o valor de  $r$  situava-se próximo de 1 e os valores de  $C_0$  e  $S$  incluíam o zero e a unidade, respectivamente.

Nestes casos, foi ainda aplicado um teste  $t$  de Student emparelhado (em inglês, “paired t-test”) aos valores obtidos pelas duas metodologias. O valor de  $t$  foi calculado com base

na expressão  $t = \frac{\bar{X}}{S} \times \sqrt{n}$ , com  $n-1$  graus de liberdade e onde  $\bar{X}$  é a média da diferença

entre cada par de valores,  $S$  é o desvio padrão e  $n$  o número de medidas. O valor calculado ( $t_{\text{calculado}}$ ) quando comparado com o valor tabelado ( $t_{\text{tabelado}}$ ), para um nível de significância de 95%, permite confirmar a concordância entre os dois métodos quando se verifica a hipótese nula [15].

## 2.6. Referências bibliográficas

- [1] Resolução Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis ANP Nº 42 Brazil 2004.
- [2] Minipuls 3 Peristaltic Pump. Disponível em <http://www.gilson.com/en/AI/Products/32.47/> [acedido em 25/01/2011].
- [3] Valcarcel M, Luque de Castro MD. Flow-injection analysis – Principles and Applications. Chichester: Ellis Horwood Limited; 1987. p. 104.
- [4] Pinto PCAG. A análise por injeção sequencial como base de sistemas automáticos em fluxo contínuo [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2005.
- [5] Albertus F, Horstkotte B, Cladera A, Cerda V. A robust multisyringe system for process flow analysis - Part I. On-line dilution and single point titration of protolytes. Analyst 1999 Sep; 124 (9): 1373-81.
- [6] Low Pressure Selectors. Disponível em <http://www.vici.com/cval/cval.php> [acedido em 25/01/2011].
- [7] 3-way Isolation Valves. Disponível em <http://www.nresearch.com/> [acedido em 25/01/2011].
- [8] Omnifit Fitting Systems. Disponível em [https://www.omnifit.com/cart/store/comersus\\_listOneCategory.asp?idCategory=281](https://www.omnifit.com/cart/store/comersus_listOneCategory.asp?idCategory=281) [acedido em 25/01/2011].
- [9] vanStaden JF, Marshall GD. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. Process Contr Qual 1992; 3: 251-61.
- [10] Alegret S, Alonso J, Bartoli J, Machado AASC, Lima JLFC, Paulis JM. Construction of equipment for potentiometric determinations in flow injection analysis. Quim Anal 1987; 6: 278-92.
- [11] Albrecht B, Wiegand W, Brown D. QuickBasic Made Easy - Version 4.5. California: McGraw-Hill, Inc.; 1989.
- [12] Becerra E, Cladera A, Cerda V. Design of a very versatile software program for automating analytical methods. Lab Robotics Automat 1999; 11 (3): 131-40.

- [13] Reis BF, Gine MF, Zagatto EAG, Lima JLFC, Lapa RA. Multicommutation in Flow-Analysis .1. Binary Sampling - Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests. *Anal Chim Acta* 1994 Jul; 293 (1-2): 129-38.
- [14] International Union of Pure and Applied Chemistry - Nomenclature, Symbols, Units and their Usage in Spectrochemical Analysis - II. Data Interpretation. *Pure and Applied Chemistry* 1976; 45: 99-103.
- [15] Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 4th ed. Great Britain: Pearson Education; 2000.
- [16] ISO 11843-2: Capability of detection-Part 2: Methodology in the linear calibration case. Geneva 2000.
- [17] Miller JN. Basic Statistical-Methods for Analytical-Chemistry .2. Calibration and Regression Methods - a Review. *Analyst* 1991 Jan; 116 (1): 3-14.



## CAPÍTULO 3

---

Determinação da glutathiona reduzida  
e da glutathiona oxidada em sangue total



### **3.1. Introdução**

O presente trabalho envolve a determinação dos substratos glutathiona reduzida e glutathiona oxidada utilizando para o efeito a enzima glutathiona redutase em solução como ferramenta bioanalítica. A metodologia escolhida é baseada no ensaio de regeneração DTNB-GR e consequente amplificação da resposta à glutathiona. Estes analitos foram determinados em matriz biológica (amostras de sangue). O ambiente reaccional para a operação da glutathiona redutase é aquoso, constituído pela solução tampão fosfato de pH igual a 7,0 unidades.

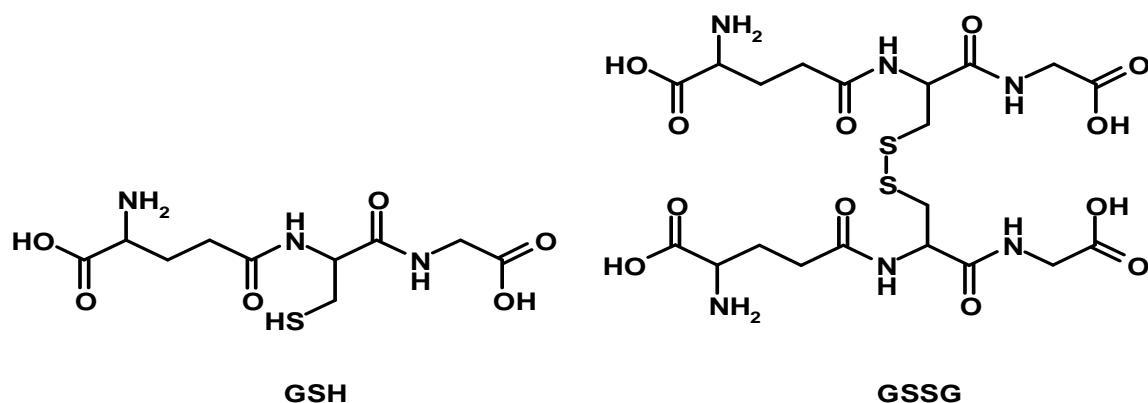
#### **3.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a determinação da glutathiona reduzida e oxidada em amostras de sangue**

A glutathiona (tripeptídeo  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina) é um tiol intracelular de baixo peso molecular que está envolvido em inúmeras funções celulares, incluindo a síntese de proteínas, metabolismo e protecção celular. A diminuição da concentração deste tiol tem sido associada a numerosas condições patológicas, tais como diabetes, doença alcoólica do fígado, SIDA, cataractogénese, artrite reumatóide, distrofia muscular, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer, síndrome respiratório agudo, erosões hemorrágicas gástricas agudas, stress oxidativo induzido por xenobióticos e envelhecimento [1]. A glutathiona encontra-se amplamente distribuída e apresenta um papel importante na protecção contra o stress oxidativo, destoxificação de xenobióticos e na modulação da actividade enzimática pelo balanço redox ( $2\text{-SH} \rightleftharpoons \text{-S-S-}$ ) [2].

Nas células, a oxidação da glutathiona reduzida (GSH), forma predominante, conduz à formação da glutathiona dissulfido (glutathiona oxidada, GSSG) (Figura 3.1.) e, por troca de dissulfidos catalisada por tioltransferases, a glutathiona pode ser incorporada em dissulfidos mistos (GSSR). O “pool” de glutathiona intracelular é eficientemente mantido na forma reduzida por uma ubíqua e crucial flavoenzima, GSSG redutase (GR), interligada ao sistema  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato ( $\text{NADP}^+$ )/NADPH (forma reduzida) [3]. Quando as células humanas são expostas a um elevado stress oxidativo, a razão GSH/GSSG decresce em consequência de uma acumulação de GSSG [4]. Assim, a razão GSH/GSSG é usada para avaliar o “status” de stress oxidativo em sistemas biológicos, o qual tem sido reconhecido em diferentes doenças crónicas.

Dado que as concentrações sanguíneas de glutathiona podem reflectir o “status” de glutathiona em órgãos menos acessíveis (tais como fígado e rim), a determinação da GSH e da GSSG no sangue tem sido considerada essencial como um índice do “status” de glutathiona global e um útil indicador de risco de doença [5]. Desta forma, um dos

objectivos deste trabalho foi o de efectuar a determinação da GSH e da GSSG no sangue total de forma a poder avaliar o “status” de glutathiona total.



**Figura 3.1.** Estruturas químicas da glutathiona reduzida (GSH) e da glutathiona oxidada (GSSG).

Existem na literatura numerosos métodos com vista à determinação de GSH e GSSG em amostras biológicas, os quais foram revistos recentemente por Monostori et al. [6], dividindo-os em métodos sem separação e em métodos com etapa de separação (métodos cromatográficos e de electroforese capilar), mas poucos são apropriados para a sua análise rotineira directa. Na Tabela 3.1. encontram-se compilados alguns métodos de determinação de GSH e GSSG em amostras de índole biológica.

Encontram-se descritos diversos métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do acrónimo em inglês “High performance liquid chromatography”) acoplados a diferentes tipos de detectores para a determinação de GSH e/ou GSSG, conforme reportado recentemente [7]. No entanto, nestes métodos é normalmente requerida uma preparação da amostra morosa com uma derivatização pré- ou pós-coluna [8] ou um equipamento particular no caso das detecções electroquímicas [9] e por espectrometria de massa [10, 11]. Em alguns casos é obtida uma sobrestimação do teor de GSSG, causada pela oxidação da GSH durante a alcalinização e a derivatização das amostras antes da injeção destas no sistema [5].

Têm sido propostos outros métodos para esta finalidade, incluindo electroforese capilar [12, 13], cromatografia micelar electrocinética (MEKC, do acrónimo em inglês “Micellar electrokinetic chromatography”) [14], electroquímicos [15], ressonância magnética nuclear (RMN) [16, 17], fluorescência [18] e métodos baseados em quimiluminiscência [19, 20].

Adicionalmente, os métodos enzimáticos são mais vantajosos que os métodos que envolvem a derivatização inespecífica dos grupos sulfidrílo com um cromóforo ou um fluoróforo [21] dada a elevada especificidade inerente. Os métodos enzimáticos dividem-se, praticamente, em duas categorias: ensaio de regeneração do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (reagente de Ellman, DTNB)-GR (primeiramente referido por Owens e Belcher [22] e mais tarde modificado por Tietze [23]) e o método do ponto final da glutathiona-S-transferase com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) [24]. No ensaio de regeneração, GSSG e/ou GSH + GSSG são determinados através do uso combinado da GR e do DTNB, constituindo este um dos métodos mais largamente aplicados devido à sua simplicidade e sensibilidade inerentes e ao seu baixo custo. O método do ponto final permite determinar apenas GSH, com maior precisão mas com menos sensibilidade que o ensaio de regeneração, no qual há uma amplificação da resposta à glutathiona. No entanto, a grande desvantagem do ensaio que emprega um esquema de amplificação de resposta ao substrato é o facto de ser laborioso e moroso aquando da análise de um largo número de amostras, sendo evidente a necessidade de aumentar o grau de automatização. Shaik e Mehvar [25] desenvolveram um ensaio em leitor de microplacas, baseado no referido ensaio de regeneração, para a determinação da GSH e GSSG em tecido de fígado e bÍlis de rato, sendo esta última avaliada após "scavenging" da GSH com o trifluorometilsulfonato de 1-metil-4-vinilpiridÍnio, o qual permitia a análise de um elevado número de amostras, apesar da grande dependência de intervenção do operador.

Neste sentido, uma tentativa de automatização foi proposta por Redegeld et al. [26], na qual a GSH e a GSSG foram determinados através de um sistema FIA, baseado na reacção de amplificação de Tietze, em hepatócitos de rato, sendo a forma oxidada avaliada depois da alquilação da forma reduzida com o *N*-etilmaleiimida (NEM). Mais recentemente, e também recorrendo a um sistema FIA, foi desenvolvido um método de quimiluminiscência para a determinação de GSH em eritrócitos hemolisados humanos, baseado no efeito desta sobre o sinal quimiluminescente resultante da oxidação do luminol pelo periodato de sódio em meio alcalino [27].

Tabela 3.1. Comparação de diferentes metodologias de determinação da glutatona em amostras biológicas

Metodologia	Deteção	Amostra biológica	Compostos	Intervalo linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Limite de detecção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Tempo de análise	Ref.
HPLC	Espectrofotometria (Ultravioleta)	Sangue humano	GSH GSSG	50-1500 2-500	0,5	Derivatização / Tempo de corrida de 24 min	[8]
HPLC	Electroquímica e Fluorimetria	Plasma	GSH GSSG	0-10 0-0,8	0,001 0,008	Derivatização / Tempo de corrida de 14 min	[9]
HPLC	Espectrometria de massa	Sangue humano	GSH GSSG	250-2000 6,25-100	-	Derivatização / Tempo de corrida de 6 min	[10]
Electroforese capilar	Fluorimetria	Plasma	GSH GSSG	0,22-45,00	0,046 0,012	Derivatização / Tempo de migração de 6 min	[12]
MEKC	Espectrofotometria (Ultravioleta)	Plasma	GSH GSSG	16-81 8-40	0,8 0,4	Tempo de corrida de 20 min	[14]
Electroquímica	Amperometria	Sangue humano	GSH	2-500	2	Equilíbrio do sinal aos 35 s	[15]
RMN	RMN de $^1\text{H}$ – Transferência de coerência de quantum duplo	Sangue de coelho	GSH	1000-50000	-	20 min	[16]
Fluorescência	Fluorimetria	Sangue humano e fígado de porco	GSH	$5,0 \times 10^{-3}$ -0,2	$1,1 \times 10^{-4}$	Derivatização de 5 min	[18]
Quililuminescência (QL)	Quililuminométrica	Sangue de coelho e microdialisado de cérebro de rato	GSH	$4,0 \times 10^{-3}$ -0,4	$5,0 \times 10^{-4}$	Reacção de QL 10 s	[19]
Não-enzimática	Fluorimetria	Sangue de rato e homogeneizados de fígado	GSH	0,065-32,5	0,065	Tempo de reacção de 15-20 min	[21]
Enzimática (GSSG reductase)	Espectrofotometria (Visível)	Sangue humano, saliva, urina, plasma de rato, homogeneizados de fígado e rim	tgSH GSSG	$3,25 \times 10^{-3}$ - $3,25 \times 10^{-2}$	-	Derivatização / Desenvolvimento de cor aos 6 min	[23]
Enzimática (GSH transferase)	Espectrofotometria (Ultravioleta)	Fígados perfundidos	GSH	1-25	0,3	Ponto final aos 5 min	[24]
Análise por injeção em fluxo	Espectrofotometria (Visível)	Hepatócitos de rato	tgSH GSSG	- 0,0-7,5	0,05	Derivatização / Tempo de residência 235 s	[26]
Análise por injeção em fluxo	Quililuminométrica	Eritrócitos hemolisados humanos	GSH	$2,0 \times 10^{-2}$ -10	$8,0 \times 10^{-3}$	Reacção de QL 8 s	[27]

De forma a ultrapassar as desvantagens inerentes aos diferentes métodos citados, nomeadamente o elevado custo do equipamento inerente e o consumo de amostras e reagentes, neste trabalho propõe-se o desenvolvimento de um sistema SIA com detecção espectrofotométrica para a automatização da determinação quer da GSH quer da GSSG no sangue total. A metodologia escolhida é baseada no ensaio de regeneração DTNB-GR, o qual tem sido aceite como método “padrão” para a determinação de glutathiona em fluidos biológicos, tais como amostras de sangue [28]. Este método responde tanto à GSH bem como à GSSG, tendo que, por conseguinte, a glutathiona total (GSH e GSSG) e a GSSG serem determinadas separadamente. A GSSG é analisada após tratamento da GSH presente na amostra com o trifluorometilsulfonato de 1-metil-2-vinilpiridínio (M2VP, do inglês “1-methyl-2-vinyl-pyridinium trifluoromethane sulfonate”). A concentração de GSH é estimada como sendo a diferença entre as concentrações de glutathiona total e da GSSG.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue no sistema SIA para a determinação da GSH e GSSG em amostras de sangue era uma solução tampão obtida por dissolução do diidrogenofosfato de potássio (Riedel-de-Haën) numa concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e sal dipotássico do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Fluka)  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . O pH desta solução era ajustado a 7,0 unidades com uma solução de hidróxido de potássio (Pronalab)  $2 \text{ mol L}^{-1}$ .

As soluções de  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de DTNB (Fluka) e  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  do sal tetrassódico de  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH, Sigma-Aldrich) eram preparadas diariamente na solução tampão.

A solução padrão concentrada de  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de GSH (Fluka) e de GSSG (Fluka) eram diariamente preparadas dissolvendo a quantidade apropriada de glutathione na solução tampão. A partir destas soluções eram preparadas as soluções padrão de trabalho por diluição adequada com tampão.

A solução de GR (EC 1.6.4.2, da levedura do pão da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em suspensão de sulfato de amónio, com actividade específica de  $160 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína, Sigma-Aldrich) de  $5 \text{ U mL}^{-1}$  era igualmente preparada na solução tampão sendo congelada a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongelada a  $25^{\circ}\text{C}$  aquando do seu uso.

A solução de DTNB era mantida à temperatura ambiente e as soluções do NADPH e dos padrões de GSH e GSSG eram colocadas em gelo no decorrer dos ensaios.

Todas estas soluções eram protegidas da luz ao longo do seu uso.

Para os estudos de penetração de zonas, recorreu-se a soluções do corante azul de bromotimol. A solução concentrada de azul de bromotimol era preparada dissolvendo 0,4 g de corante em 25 mL de etanol 96 %, perfazendo-se o volume de 100 mL com uma solução de bórax  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Seguidamente preparava-se uma solução de trabalho diluindo 1 mL da solução de azul de bromotimol em 199 mL de solução de bórax [29].



### **3.2.2. Colheita da amostra e processamento**

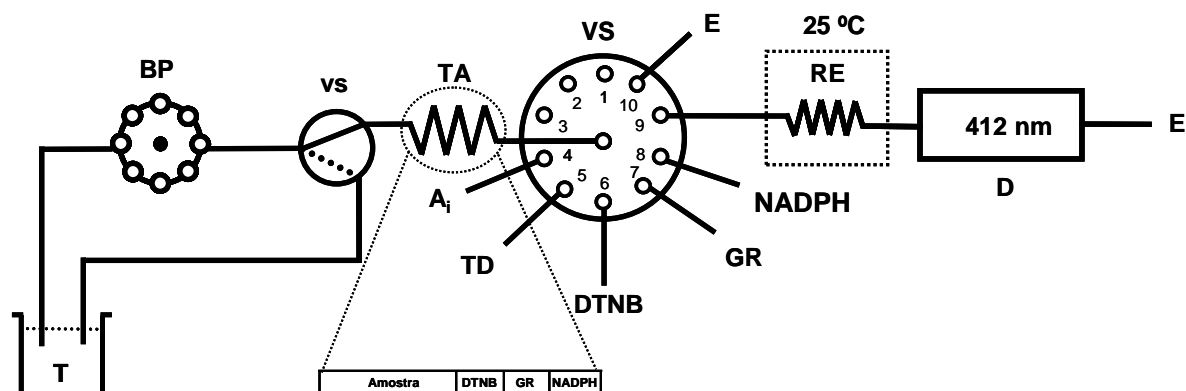
As amostras de sangue eram fornecidas por voluntários adultos saudáveis. O sangue venoso era colhido para tubos contendo EDTA como anticoagulante. Seguidamente, eram colocadas alíquotas de 50 ou 100  $\mu\text{L}$  de sangue em tubos de microcentrífuga para a determinação da GSH total ou da GSSG, respectivamente. Para a avaliação da GSSG, eram previamente adicionados nos tubos de microcentrífuga 10  $\mu\text{L}$  do agente sequestrante de grupos tiol, M2VP (OxisResearch, Portland), de forma a evitar a auto-oxidação da GSH [30]. As amostras eram depois congeladas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , podendo o tempo de análise das mesmas estender-se por um período de 30 dias. O processamento propriamente dito das amostras de sangue incluía o descongelamento das mesmas e uma etapa de precipitação proteica com ácido meta-fosfórico (Fluka) a 5 % (m/v) a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A mistura era depois agitada em vórtice e centrifugada a 14 000 rotações por minuto durante 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Os sobrenadantes resultantes eram directamente analisados pelo método desenvolvido ou, após diluição com o tampão, analisados pela metodologia convencional de comparação adoptada.

### **3.2.3. Aparelhagem**

O sistema de injeção sequencial apresentava na unidade propulsora um tubo de impulsão de PVC com 1,02 mm de diâmetro interno. O tubo de armazenamento e o reactor apresentavam comprimentos de 150 e 300 cm, respectivamente, ambos com configuração em figuras de oito. O tubo de diluição apresentava um comprimento de 100 cm e era enrolado com a mesma configuração que os anteriores.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 3.2.), designadamente, bomba peristáltica, válvulas, banho termostatizado, espectrofotómetro e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.

(A)



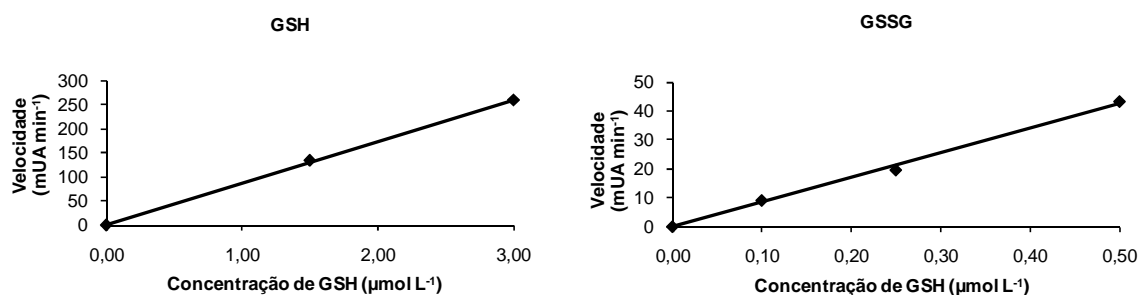
(B)



**Figura 3.2.** (A) Esquema do módulo analítico desenvolvido para a quantificação da glutatona reduzida e oxidada em amostras de sangue humano: **T** – Solução transportadora de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,0; **BP** – Bomba peristáltica bidireccional; **vs** – Válvula solenóide; **TA** – Tubo de armazenamento; **VS** – Válvula selectora de fluidos; **A<sub>i</sub>** – Amostra; **TD** – Tubo de diluição; **DTNB** – Solução de DTNB  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; **GR** – Solução de glutatona redutase  $5 \text{ U mL}^{-1}$  (também imersa no banho termostatizado a  $25^{\circ}\text{C}$ ); **NADPH** – Solução de NADPH  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$ ; **RE** – Reactor; **D** – Detector espectrofotométrico ( $\lambda = 412 \text{ nm}$ ); **E** – Esgoto. (B) Fotografia da montagem desenvolvida.

### **3.2.4. Metodologia convencional de comparação**

Para a avaliação da exactidão dos resultados fornecidos pela metodologia SIA, determinou-se também o teor de GSH e GSSG presente nas amostras de sangue usando um kit comercializado pela Bioxytech “GSH/GSSG-412 assay” (Cat. No. 21040). Estes kits são usados frequentemente em laboratórios clínicos e, devido ao facto de não estar definido um método de referência para esta determinação, quer para o pré-tratamento da amostra quer para a quantificação da glutatona em amostras de sangue, justifica-se o uso do mesmo como metodologia de comparação. Esta permite a avaliação espectrofotométrica dos teores de GSH e GSSG recorrendo ao método de Tietze [23]. O ensaio propriamente dito começava com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de tampão (ensaio em branco) ou de um dos padrões de GSSG incluídos no kit (0,050-1,500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) (ou das amostras correspondentes à determinação da GSH total ou da GSSG) para uma cuvete. De seguida procedia-se às adições de 200  $\mu\text{L}$  do cromogénio DTNB e 200  $\mu\text{L}$  de GR com subsequente mistura e incubação à temperatura ambiente por um período de 5 minutos. Finalmente, eram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de NADPH e registava-se a absorvância a 412 nm durante 3 minutos. Desta forma, eram determinadas as velocidades de reacção em  $\text{mUA min}^{-1}$ . Depois eram estabelecidas as curvas de calibração dos padrões de GSSG incluídos no kit da seguinte forma: no caso da determinação da GSH total, eram consideradas as concentrações de 0; 1,50 e 3,00  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e no caso da determinação da GSSG eram consideradas as concentrações de 0; 0,10; 0,25 e 0,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , dada a grande diferença de concentrações entre a GSH total e a GSSG (Figura 3.3.). As concentrações de GSH total e de GSSG das amostras de sangue eram então obtidas após interpolação nas curvas de calibração e multiplicação dos valores obtidos pelo factor de diluição aplicado (60 ou 488 no caso das determinações da GSSG ou da GSH total, respectivamente).



**Figura 3.3.** Curvas de calibração para a GSH (Velocidade ( $\text{mUA min}^{-1}$ ) =  $85,93 (\pm 21,96) C_{\text{GSH}}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) +  $1,497 (\pm 42,54)$ ,  $R^2 = 0,9996$ ) e para a GSSG (Velocidade ( $\text{mUA min}^{-1}$ ) =  $85,52 (\pm 15,33) C_{\text{GSSG}}$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) -  $0,239 (\pm 4,35)$ ,  $R^2 = 0,9965$ ) obtidas usando a metodologia convencional de comparação, expressas em GSH.

### 3.2.5. Procedimento experimental

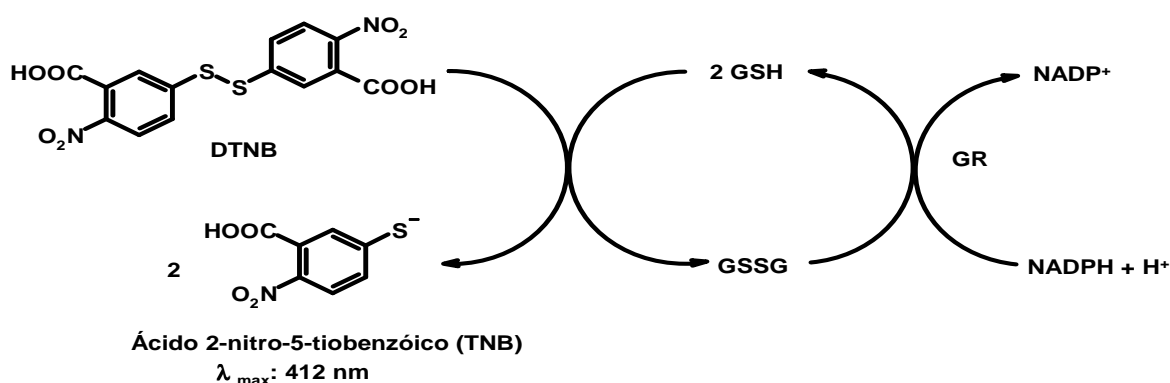
O ciclo analítico proposto para a determinação da GSH e GSSG em amostras de sangue total era composto por 9 etapas (Tabela 3.2.), quando o procedimento de diluição dentro do sistema das amostras era necessário (etapas D1-D2, Tabela 3.2.). Assim, 25 ou 50  $\mu\text{L}$  de amostra eram aspirados para o TA e em seguida estas zonas aspiradas eram propulsionadas para o tubo de diluição (Figura 3.2., TD), por um período de tempo previamente definido, garantindo a diluição da amostra para níveis de glutathiona total e oxidada determináveis pela metodologia desenvolvida (etapas D1-D2). A aspiração dos 200  $\mu\text{L}$  de amostra (etapa a) ocorria então a partir do tubo de diluição, nos casos em que fora aplicado o procedimento de diluição, ou a partir da porta da válvula correspondente à amostra para o TA. Depois eram sequencialmente aspirados para o TA 50  $\mu\text{L}$  de DTNB, 50  $\mu\text{L}$  de GR e 50  $\mu\text{L}$  de NADPH (etapas b-d) e com inversão do sentido de fluxo o conjunto destas quatro zonas era propulsionado até ao reactor (etapa e), o qual se encontrava imerso num banho termostatzado (Figura 3.2.). Após um período de paragem de fluxo de 120 segundos no reactor (etapa f), a zona de reacção era propulsionada para o detector a um caudal de  $1,90 \text{ mL min}^{-1}$  (etapa g).

**Tabela 3.2.** Protocolo analítico para a determinação da glutatona reduzida e glutatona oxidada em amostras de sangue

Etapa	Posição da válvula	Tempo de operação (s)	Caudal (mL min <sup>-1</sup> )	Volume (μL)	Descrição
D1	4	3	0,50	25	Aspiração da amostra de GSH para o TA
		6		50	Aspiração da amostra de GSSG para o TA
D2	5	8,70	2,00	290	Diluição da amostra de GSH
		5,85		195	Diluição da amostra de GSSG
a	4/5	15	0,80	200	Aspiração da amostra diluída/padrão para o TA
b	6	3,75	0,80	50	Aspiração da solução 3,0 mmol L <sup>-1</sup> DTNB para o TA
c	7	3,75	0,80	50	Aspiração da solução 5,0 U mL <sup>-1</sup> GR para o TA
d	8	3,75	0,80	50	Aspiração da solução 1,2 mmol L <sup>-1</sup> NADPH para o TA
e	9	37	1,90	1172	Propulsão do conteúdo do TA até ao reactor
f	9	120	-	-	Período de paragem
g	9	81	1,90	2565	Aquisição do sinal analítico e propulsão do líquido transportador para lavar a célula de fluxo

### 3.3. Resultados e sua discussão

A amplificação da resposta à glutatona utilizada resulta da acção combinada do DTNB e da GR (Figura 3.4.). Esta reacção é baseada no aumento de absorvância a 412 nm causado pela redução do DTNB pela GSH, gerando a GSSG e o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB) (na forma de anião tiolato), composto de cor amarela. Na presença da GR dá-se a oxidação do cofactor NADPH pela GSSG gerada, levando à formação da GSH, que entra novamente no ciclo de amplificação. A quantidade de TNB formada é proporcional à soma de GSH e GSSG presentes. Com a junção destas duas reacções, obtém-se assim um ciclo de amplificação que aumenta drasticamente a sensibilidade do método de determinação da glutatona. O factor de amplificação foi avaliado através da comparação dos declives das rectas de calibração obtidos com o sistema de amplificação ( $\text{Abs (U.A.)} = 0,1231C_{\text{GSH}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,097$ ,  $R^2 = 0,9989$ ) e com a reacção entre o GSH e o DTNB, sem a GR e o cofactor NADPH ( $\text{Abs (U.A.)} = 0,0044C_{\text{GSH}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,050$ ,  $R^2 = 0,9956$ ). Verificou-se que no modo estequiométrico a resposta à glutatona foi apenas 3,6 % da resposta obtida com o sistema de amplificação.



**Figura 3.4.** Ensaio de regeneração DTNB-glutationa redutase.

### 3.3.1. Optimização do sistema

Com o objectivo de obter uma sensibilidade que viabilizasse a determinação dos baixos teores de GSSG presentes no sangue, os diferentes parâmetros do sistema foram estudados e optimizados. O intervalo estudado para as diferentes variáveis bem como os valores seleccionados estão sumarizados na Tabela 3.3.

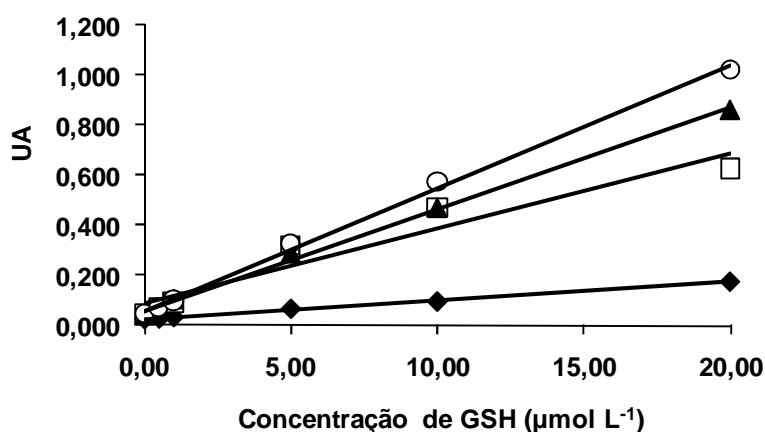
A optimização do sistema foi efectuada usando padrões de GSH dado o seu menor custo comparativamente aos padrões de GSSG. A redução de uma molécula de GSSG origina duas moléculas de GSH e como tal a resposta à GSSG é o dobro da resposta à GSH para concentrações equimolares, como foi comprovado com ensaios de padrões mistos de GSH e GSSG.

Após alguns estudos preliminares, foram escolhidas como condições de partida para a optimização dos parâmetros químicos e físicos do sistema: padrões de GSH até 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; caudal do tampão transportador igual a 0,70  $\text{mL min}^{-1}$ ; pH igual a 7,5 unidades; um reactor com 75 cm de comprimento e volumes iguais a 50  $\mu\text{L}$  de DTNB, GR e NADPH.

**Tabela 3.3.** Intervalos de valores estudados na optimização dos diferentes parâmetros do sistema e os valores escolhidos para a sua operação

Parâmetro	Intervalo	Valor seleccionado
Concentração da enzima ( $\text{U mL}^{-1}$ )	0,4 – 5,0	5,0
Concentração de NADPH ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	0,4 – 1,6	1,2
Concentração de DTNB ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	1,5 – 3,0	3,0
Volume de amostra ( $\mu\text{L}$ )	50 - 300	200
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Banho de gelo - 30	25
Concentração do tampão fosfato ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	100 - 400	100
pH da solução tampão transportadora	6,5 – 8,5	7,0
Tempo de paragem de fluxo no reactor (s)	0 – 200	120
Caudal de propulsão do transportador ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,70 – 2,86	1,90

A ordem de aspiração dos reagentes constitui um factor importante que exerce influência sobre a amplitude do sinal analítico e dispersão [31]. No presente trabalho, esta influência é ainda mais pronunciada na medida em que é considerada a sobreposição de quatro zonas. A ordem pela qual as quatro soluções eram aspiradas para o TA era a seguinte: padrão/amostra, DTNB, enzima e NADPH (Figura 3.2. A). Apesar de haver uma sobreposição completa destas quatro zonas aquando da passagem no detector, a amostra e o DTNB eram aspirados primeiro para minimizar a dispersão quer da enzima quer do NADPH. No caso do DTNB, observava-se uma diminuição do sinal analítico de cerca de 15% se este fosse o primeiro reagente a ser aspirado. Desta forma, a alíquota de maior volume (200  $\mu\text{L}$ ), referente ao padrão/amostra, era a primeira a ser aspirada seguido do DTNB e dos outros dois reagentes, iniciando-se assim a reacção de amplificação.



**Figura 3.5.** Estudo de diferentes concentrações do par GR/NADPH: (◆) 0,4 U mL<sup>-1</sup> GR / 0,4 mmol L<sup>-1</sup> NADPH; (□) 5,0 U mL<sup>-1</sup> GR / 0,4 mmol L<sup>-1</sup> NADPH; (▲) 4,0 U mL<sup>-1</sup> GR / 0,8 mmol L<sup>-1</sup> NADPH e (○) 5,0 U mL<sup>-1</sup> GR / 0,8 mmol L<sup>-1</sup> NADPH.

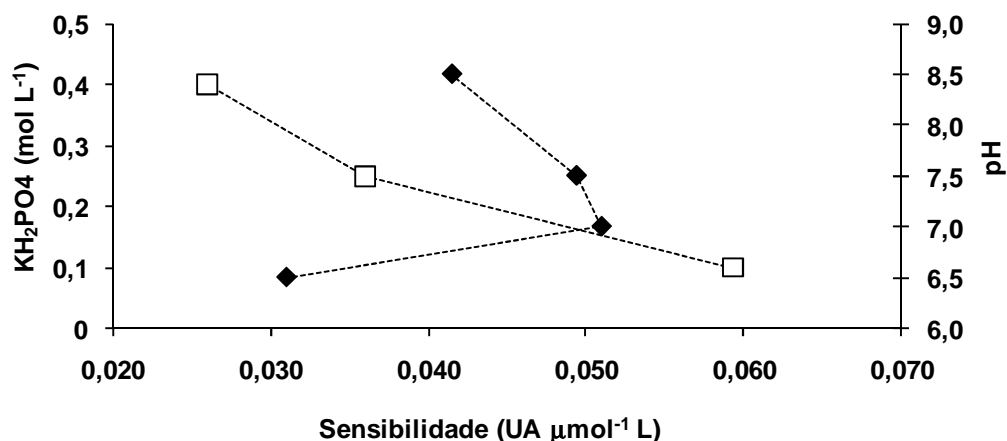
A extensão da reacção de amplificação depende, entre outros, de dois parâmetros que estão interligados: concentração de GR e NADPH. Assim, a concentração de GR foi estudada entre 0,4 e 5,0 U mL<sup>-1</sup> e verificou-se um aumento do sinal analítico com a concentração (Figura 3.5.). Estabelecendo 5,0 U mL<sup>-1</sup> como a concentração limitante de GR, avaliou-se a concentração do seu cofactor NADPH no intervalo 0,4-1,6 mmol L<sup>-1</sup>. Observou-se um aumento de 30 % da actividade enzimática até à concentração de 1,2 mmol L<sup>-1</sup> de NADPH. A diferença de apenas de 2 % entre as concentrações de 1,2 e 1,6 mmol L<sup>-1</sup> não justificava o uso de concentrações superiores à de 1,2 mmol L<sup>-1</sup>.



Seguidamente foram efectuadas curvas de calibração para diferentes concentrações de DTNB (1,5 - 3,0 mmol L<sup>-1</sup>) e verificou-se um aumento da produção de TNB de cerca de 20% usando uma concentração de 3,0 mmol L<sup>-1</sup>, apesar da perda de linearidade para concentrações superiores a 10 µmol L<sup>-1</sup> de GSH. Para usufruir de um novo aumento da concentração de DTNB, seria necessário aumentar em simultâneo as concentrações dos outros reagentes envolvidos na reacção de amplificação. Desta forma, foi escolhida uma concentração de DTNB igual a 3,0 mmol L<sup>-1</sup>.

Por outro lado, o sinal de branco, devido à redução lenta do DTNB pela GR [32] influencia o limite de quantificação do método mascarando a diferença entre o sinal do branco e do padrão de GSH 0,5 µmol L<sup>-1</sup>, o que pode limitar a avaliação do teor de GSSG nalgumas amostras de sangue. Neste sentido, e sabendo que o aumento de volume de amostra é uma forma efectiva de aumentar a sensibilidade [33], foram estudados diferentes volumes de amostra entre 50 e 300 µL. Com um volume de amostra igual a 50 µL, a diferença entre o sinal do padrão de GSH 0,5 µmol L<sup>-1</sup> e do branco não é significativa, havendo um aumento da sensibilidade de cerca de 40% até um volume de 200 µL, o qual foi escolhido para os estudos de optimização seguintes.

A actividade da GR é dependente do pH e como tal foi estudada a influência da composição do tampão. O tampão era inicialmente preparado como descrito em [34]: solução de dihidrogenofosfato de potássio numa concentração de 0,1 mol L<sup>-1</sup> e EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> com pH igual a 7,5 unidades. Tanto a concentração de dihidrogenofosfato de potássio como o valor de pH foram avaliados (Figura 3.6.). A concentração de tampão foi estudada entre 0,1 e 0,4 mol L<sup>-1</sup>. Para concentrações de GSH entre 0,50 e 10,00 µmol L<sup>-1</sup>, foram estabelecidas curvas de calibração a um pH igual a 7,5 unidades. Um aumento da concentração de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> traduziu-se na diminuição do sinal analítico, provavelmente devido a um aumento da força iónica do meio reaccional e consequente inibição da actividade da GR [35]. Para a avaliação do pH, foram efectuadas curvas de calibração para valores de pH entre 6,5 e 8,5 e o máximo de sensibilidade foi obtido a pH 7,0. A pH 6,5, a sensibilidade era 39,2% menor que a obtida a pH 7,0 e o seu valor diminuía para valores de pH superiores a 7,0 (3,1 e 18,6% para valores de pH iguais a 7,5 e 8,5 unidades, respectivamente). Assim, quando todas as soluções foram preparadas em tampão pH 7,0, verificou-se um aumento da sensibilidade do método, com uma redução do intervalo de zona linear (até 3,00 µmol L<sup>-1</sup> GSH). Deste modo, foi usado um tampão de concentração 0,1 mol L<sup>-1</sup> e com pH igual a 7,0 unidades para a realização de ensaios posteriores, sendo inclusive o pH das amostras ajustado a 7,0 unidades, garantindo assim um valor de pH constante e subsequentemente evitando quaisquer flutuações do pH óptimo dentro da montagem desenvolvida.

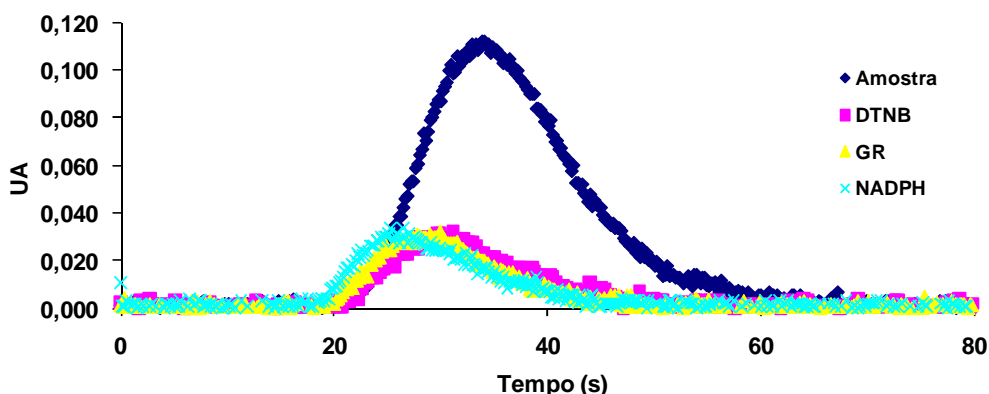


**Figura 3.6.** Estudo da influência da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (□) e do pH (◆) da solução transportadora na sensibilidade do método.

Para avaliar a influência da temperatura sobre a actividade enzimática, a solução de GR foi ensaiada em três condições físicas diferentes: mergulhada em banho de gelo, colocada num banho termostatzado a 25 e a 30°C. Para as diferentes condições testadas verificou-se um aumento da actividade até 25°C com a obtenção de sinais analíticos de maior magnitude e precisão.

Nas condições optimizadas, nesta reacção de amplificação, é atingida uma completa sobreposição das quatro zonas envolvidas com um tubo de reacção com 300 cm de comprimento e com configuração em figuras de oito, conforme comprovado com os ensaios efectuados com o azul de bromotimol (Figura 3.7.). Nos sistemas de fluxo, o sinal analítico é adquirido antes do estabelecimento do equilíbrio químico e a extensão da reacção é condicionada para além das características do tubo de reacção pelos caudais de fluxo empregues [36]. Assim, o caudal de propulsão do transportador foi estudado entre 0,70 e 2,86  $\text{mL min}^{-1}$  e obteve-se um aumento da absorvância com a diminuição do caudal, apesar de ser insuficiente para obter a sensibilidade desejada, provavelmente devido ao concomitante aumento da dispersão. Deste modo, é importante obter uma condição que por um lado limite a dispersão e por outro lado proporcione um maior tempo de reacção. Neste sentido, foi implementado um período de paragem de fluxo no reactor, imerso no banho termostatzado. Apesar do aumento da sensibilidade com o tempo, foram adoptados um tempo de paragem de 120 segundos e um caudal de propulsão do transportador igual a 1,90  $\text{mL min}^{-1}$  como um compromisso entre o ritmo de amostragem

e a sensibilidade de modo a permitir a determinação de GSH e GSSG nos níveis de concentração presentes nas amostras de sangue.



**Figura 3.7.** Registo gráfico da penetração de zonas correspondentes aos reagentes envolvidos na reacção de amplificação.

### 3.3.2. Análise de amostras de sangue humano

Os níveis de GSH e GSSG determinados, presentes no sangue de indivíduos normais, são altamente dependentes do processamento e armazenamento das amostras empregues. Desta forma, o processamento das amostras constitui uma etapa chave para a determinação exacta de GSH e especialmente de GSSG. As concentrações de GSH/GSSG determinadas são influenciadas pelos seguintes factores: (a) oxidação dos tióis em amostras acidificadas; (b) oxidação após armazenamento a pH neutro/alcalino; (c) oxidação durante a etapa de desproteinização; (d) mudança no equilíbrio GSH/GSSG devido ao “bloqueio” irreversível dos tióis livres e (e) reacção dos grupos electrofílicos com grupos amina. É de salientar que a oxidação durante a etapa de desproteinização com ácido pode influenciar e mesmo produzir artefactos (30-150  $\mu\text{mol L}^{-1}$  GSSG podem ser produzidos por este procedimento) [5]. Desta forma, o método de processamento a adoptar deve ter em conta as fontes de erro descritas.

Inicialmente o ácido 5-sulfosalicílico a 5 % (m/v) [37], habitualmente usado para a precipitação das proteínas presentes nas amostras de sangue, foi considerado para análise. No entanto, este foi abandonado já que este tipo de ácido dava origem a valores de GSH superiores às quantidades adicionadas às amostras de sangue (ensaios de

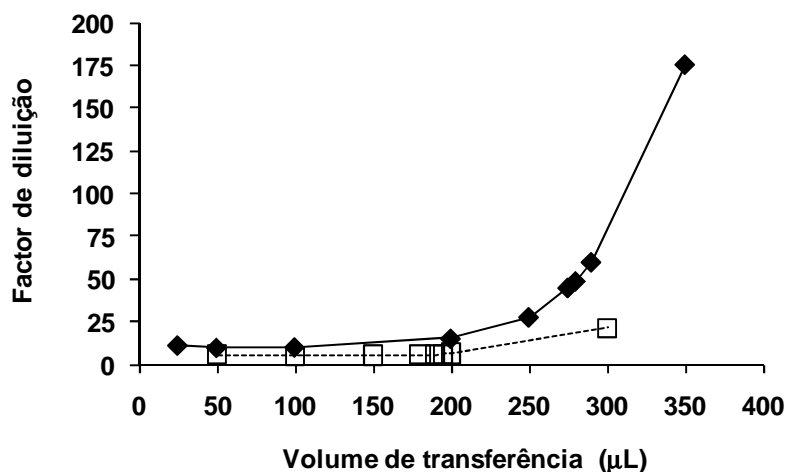
recuperação). Pensou-se que esta ocorrência era devida à formação de complexos por reacção do soro e o ferro da hemoglobina [38] com o ácido 5-sulfosalicílico durante o processamento das amostras, os quais exibem absorção no comprimento de onda utilizado (412 nm) [39]. Desta forma, o ácido meta-fosfórico foi seleccionado para a etapa de desproteinização [40], a qual é de extrema importância já que evita a degradação da GSH e GSSG catalisada pela  $\gamma$ -glutamyltransferase e previne a auto-oxidação da GSH [30].

Antes da quantificação da GSSG pelo ensaio de regeneração do DTNB-GR, as amostras de sangue são submetidas a um apropriado sequestro (“scavenging”) dos grupos tiol, recorrendo para o efeito ao NEM [3] ou 2-vinilpiridina (2-VP) [41], para evitar a oxidação rápida da GSH em extractos biológicos, aparentemente causada pela presença das proteínas que a oxidam. Na verdade, a GSH oxida-se rapidamente em amostras homogeneizadas de tecidos e de sangue ao ponto de durante o período de apenas 10 minutos uma fracção substancial de GSH oxidar-se formando GSSG [30]. No método proposto, as amostras de sangue foram tratadas com um derivado da 2-VP, 1-metil-2-vinilpiridínio (M2VP), o qual aprisiona rapidamente os grupos tiol (em menos de 1 minuto) e não exerce qualquer acção inibitória sobre a GR [42]. Deste modo, não é necessário qualquer procedimento de remoção do agente sequestrante de grupos tiol antes da reacção de amplificação, como acontece quando o NEM é usado, e esta reacção de derivatização apresenta uma cinética rápida contrariamente aquando do uso da 2-VP que permite alguma auto-oxidação da GSH durante esta derivatização lenta. Além disso, os teores de GSSG foram avaliados usando 2-VP e o M2VP e verificou-se uma sobrestimação de cerca de 5 vezes com o primeiro.

Tendo em conta os teores de GSH e GSSG habitualmente presentes no sangue (aproximadamente  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e alguns  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente) [43] e dada a variabilidade existente entre as diferentes amostras, foi desenvolvido um procedimento de diluição dentro do próprio sistema SIA para, quando necessário, ajustar as concentrações reais de GSH e GSSG presentes nas amostras ao intervalo de resposta linear do método proposto.

Várias estratégias de diluição em linha têm vindo a ser utilizadas em sistemas SIA, de modo a tornar os sistemas analíticos mais autónomos e a obter graus de diluição apropriados, por um processo controlado e reprodutível, já que a diminuição do volume de amostra não é muitas vezes suficiente para atingir os níveis de diluição desejados. Assim, e fazendo uso da simplicidade e versatilidade da válvula selectora de multiposições para o pré-tratamento de amostras, na maioria dos casos, os procedimentos de diluição em linha são implementados recorrendo a um tubo de diluição, colocado numa das portas da válvula selectora, para gerar um gradiente de

concentrações [44-50]. No sistema de fluxo desenvolvido a diluição era conseguida recorrendo a um tubo de diluição, localizado numa das portas da válvula selectora (Figura 3.2., TD), através da análise de uma secção do gradiente de concentração aí gerado, e traduziu-se na adição de apenas duas etapas ao ciclo analítico descrito anteriormente (Tabela 3.2, etapas D1-D2). Num procedimento de diluição deste género o grau de diluição depende do volume de amostra (volume de amostra aspirado a partir da porta 4 para o TA – etapa D1, Tabela 3.2.), do volume de transferência (que inclui o volume de amostra bem como de transportador transferidos do TA para o TD – etapa D2, Tabela 3.2.) e do volume de análise (volume de alíquota aspirado do TD para o TA) [45]. Estes três parâmetros foram estudados e optimizados de forma a obterem-se factores de diluição de 60 e 6 para as amostras de GSH e GSSG, respectivamente, garantindo assim a análise de amostras num largo intervalo de concentrações de glutathiona. Uma vez que o procedimento de diluição pretendia introduzir o mínimo de alterações na metodologia, já optimizada, considerou-se como volume final 200  $\mu$ L (aspirado a partir do TD), volume já optimizado para a determinação directa sem diluição da amostra. Sendo assim, o perfil do gradiente de concentração gerado no TD e consequentemente correspondendo aos referidos 200  $\mu$ L, resulta do efeito combinado entre o volume de amostra utilizado e da dispersão que esta zona sofria durante o seu percurso do TA até ao TD. Os factores de diluição acima apontados foram obtidos com uma boa repetibilidade usando volumes de amostra de 25 ou 50  $\mu$ L e volumes de transferência de 290 ou 195  $\mu$ L para as amostras de GSH total e GSSG, respectivamente. É de salientar que outros factores de diluição podiam ser obtidos através da mudança do volume de transferência (Figura 3.8.). Os estudos relativos ao procedimento de diluição decorreram comparando os sinais analíticos obtidos por diluição de padrões no interior do sistema, pelo procedimento de diluição desenvolvido, com os fornecidos pela análise de padrões preparados por diluição volumétrica manual, fora do sistema de fluxo, de forma a estabelecer o nível de diluição atingido em cada situação.



**Figura 3.8.** Influência do volume de transferência, para o tubo de diluição, no factor de diluição obtido, usando 25 (♦) e 50 µL (□) de amostra. Factor de diluição: grau de diluição obtido pela razão entre os sinais obtidos com e sem diluição.

### 3.3.3. Estudo de interferentes

Agentes redutores tais como ácido ascórbico,  $\beta$ -mercaptoetanol, ditioneitol e cisteína ou mesmo compostos que reagem com grupos tióis podem interferir com o ensaio da glutatona. Desta forma, compostos com grupos SH, agentes redutores e materiais reactivos a grupos SH devem ser evitados durante o processamento da amostra, uma vez que podem reagir com o DTNB [26].

Para avaliar se os diferentes compostos análogos à GSH constituíam interferentes, a sua resposta era comparada com a obtida para o padrão de GSH. Os valores foram expressos como percentagem de padrão de GSH. Um composto era considerado interferente quando este originava uma variação na resposta superior a 5 % em relação à resposta obtida para o padrão GSH de igual concentração. Os análogos testados bem como os valores de interferência são os indicados na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4.** Estudo dos análogos de GSH como possíveis interferentes

Análogos	$\mu\text{mol L}^{-1}$	Absorvância	$\mu\text{mol L}^{-1}$ GSH	% GSH
GSH	7,50	0,685	7,50	100,00
Cisteína	7,50	0,094	0,36	4,83
Ácido ascórbico	7,50	0,078	0,17	2,32
N-acetilcisteína	7,50	0,101	0,44	5,93
Ditiotreitol	7,50	0,126	0,75	9,94
Penicilamina	7,50	0,105	0,49	6,53
$\beta$ -mercaptoetanol	7,50	0,102	0,46	6,14

Para eliminar qualquer grau de interferência dos compostos estudados, testaram-se iguais concentrações de GSH e dos seus análogos, sendo que o GSH é o tiol não-proteico mais abundante nas amostras biológicas [51]. Observou-se nas condições apontadas uma interferência não significativa quer do ácido ascórbico quer da cisteína (compostos endógenos). Assim, mesmo a cisteína, o segundo tiol mais abundante no sangue, não interfere na determinação da glutathiona [51]. Neste sentido, pode-se afirmar que o método proposto permite a determinação directa e selectiva da glutathiona na presença da cisteína. Por outro lado, verificou-se que os compostos não endógenos, como a N-acetilcisteína, ditiotreitol, penicilamina e o  $\beta$ -mercaptoetanol, podem interferir no ensaio da glutathiona.

### 3.3.4. Figuras de mérito e validação do método desenvolvido

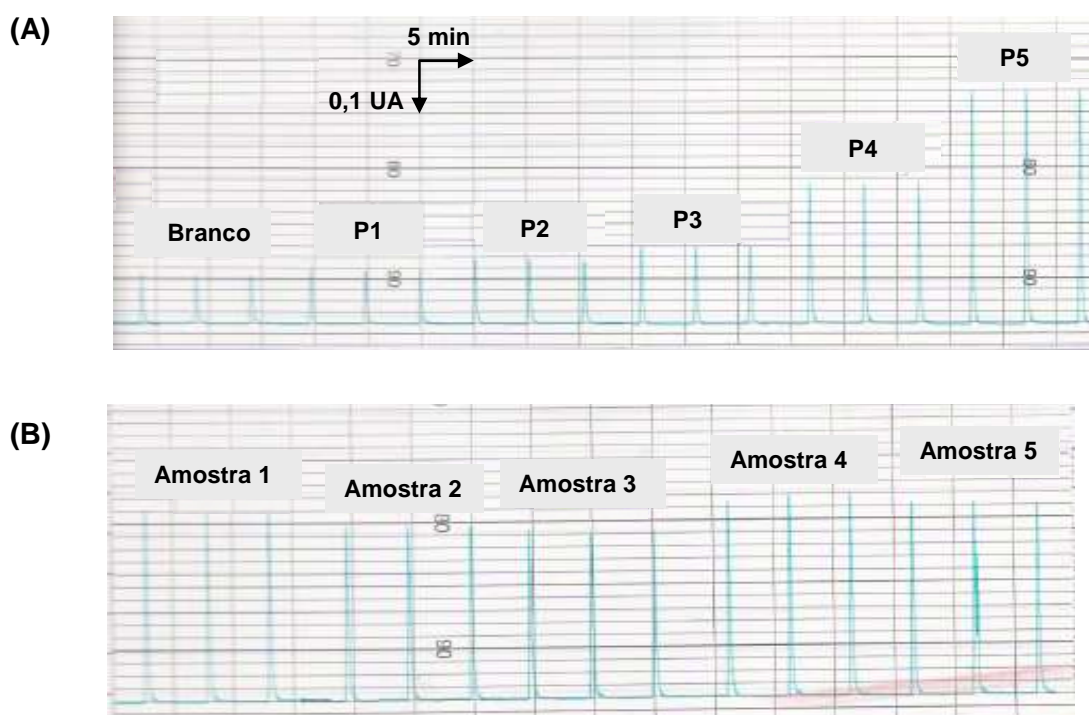
Nas condições optimizadas, foram obtidas curvas de calibração ( $\text{Abs (U.A.)} = 0,123 (\pm 0,002) C_{\text{GSH}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,097 (\pm 0,003)$ ,  $R^2=0,9989$ ;  $\text{Abs (U.A.)} = 0,245 (\pm 0,003) C_{\text{GSSG}} (\mu\text{mol L}^{-1}) + 0,098 (\pm 0,002)$ ,  $R^2=0,9994$ ), com intervalo de resposta linear até 3,00 e 1,50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a GSH e GSSG, respectivamente, permitindo a sua determinação em amostras de sangue humano. Observou-se que GSH e GSSG dão origem à mesma curva de calibração quando expressas em equivalentes de GSH, estando de acordo com resultados anteriores [22, 23].

O limite de detecção foi de 0,031  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a GSH e 0,014  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para a GSSG.

Relativamente à repetibilidade do procedimento SIA, foram determinados valores de RSD de 4,4 % para amostras de GSSG ( $2,05 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e 1,5 % para GSH total ( $810,93 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), o que mostra diferenças não significativas num intervalo alargado de concentrações.

O tempo requerido para completar um ciclo analítico foi de 280 segundos, o que corresponde a cerca de 13 determinações por hora.

Na Figura 3.9. apresenta-se um registo obtido durante os ensaios, com a metodologia SIA.



**Figura 3.9.** Registo obtido na análise do teor de GSSG em amostras de sangue humano. **(A)** branco e série de padrões com as concentrações em GSSG de 0,050 (P1); 0,125 (P2); 0,250 (P3); 0,750 (P4) e 1,500 (P5)  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; **(B)** amostras de sangue humano. Em todos os casos procedeu-se à injeção em triplicado.

Finalmente, a metodologia de fluxo otimizada foi aplicada na determinação de GSH total e GSSG (por diferença obtém-se a GSH) em amostras de sangue total. De forma a avaliar a exactidão do método desenvolvido, os resultados obtidos por análise de 14 amostras de sangue total no sistema SIA foram comparados com os fornecidos pela metodologia de comparação referida.



Os resultados encontram-se na Tabela 3.5, onde também se podem analisar os desvios relativos obtidos entre as duas metodologias. Como se pode observar não se verificaram desvios estatisticamente significativos entre os resultados obtidos pela metodologia de fluxo e de comparação, apesar do desvio relativo ter sido superior a 5 % para 3 amostras de GSSG.

**Tabela 3.5.** Resultados obtidos pela metodologia SIA e pela metodologia de comparação para a determinação de glutatona total e glutatona oxidada em amostras de sangue total

Amostras	SIA		Metodologia de comparação		Desvio relativo (%)	
	GSH total <sup>a</sup> (mmol L <sup>-1</sup> )	GSSG <sup>a</sup> (μmol L <sup>-1</sup> )	GSH total <sup>b</sup> (mmol L <sup>-1</sup> )	GSSG <sup>b</sup> (μmol L <sup>-1</sup> )	GSH total	GSSG
1	0,80 (±0,01)	0,99 (±0,07)	0,823 (±0,02)	1,0 (±0,1)	-3,1	-3,9
2	0,655 (±0,004)	2,6 (±0,2)	0,66 (±0,02)	2,9 (±0,2)	-0,2	-10,1
3	0,79 (±0,01)	1,28 (±0,01)	0,766 (±0,005)	1,06 (±0,05)	+3,3	+20,8
4	0,81 (±0,01)	7,6 (±0,3)	0,78 (±0,01)	7,6 (±0,1)	+3,4	+1,1
5	0,910 (±0,007)	5,48 (±0,07)	0,89 (±0,01)	5,2 (±0,2)	+2,4	+4,6
6	0,759 (±0,009)	1,4 (±0,2)	0,77 (±0,01)	1,4 (±0,2)	-1,6	+0,7
7	0,826 (±0,005)	1,5 (±0,3)	0,81 (±0,02)	1,51 (±0,08)	+1,8	+1,3
8	0,77 (±0,02)	1,0 (±0,3)	0,78 (±0,02)	1,0 (±0,4)	-2,2	+5,1
9	0,89 (±0,01)	8,2 (±0,4)	0,92 (±0,02)	8,6 (±0,1)	-3,2	-3,9
10	0,805 (±0,009)	7,3 (±0,2)	0,78 (±0,01)	7,4 (±0,2)	+3,4	-1,4
11	0,69 (±0,02)	7,5 (±0,2)	0,670 (±0,003)	7,8 (±0,2)	+3,0	-4,6
12	1,04 (±0,01)	1,3 (±0,2)	0,1018 (±0,007)	1,08 (±0,07)	+2,4	+22,2
13	0,693 (±0,002)	1,55 (±0,07)	0,71 (±0,01)	1,51 (±0,01)	-2,9	+2,6
14	0,96 (±0,01)	0,48 (±0,06)	0,97 (±0,01)	0,50 (±0,05)	-0,9	-4,0

<sup>a</sup> média e desvio padrão de 3 determinações consecutivas

<sup>b</sup> média e desvio padrão de 2 determinações consecutivas

Os resultados obtidos por aplicação das metodologias a amostras de sangue total foram ainda confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear entre as duas metodologias, tanto para a GSH total ( $C_{\text{SIA}} (\mu\text{mol L}^{-1}) = 8 (\pm 105) + 1,0 (\pm 0,1) C_{\text{Método de comparação}} (\mu\text{mol L}^{-1})$ ,  $r=0,9797$ ) como para a GSSG ( $C_{\text{SIA}} (\mu\text{mol L}^{-1}) = 0,1 (\pm 0,2) + 0,97 (\pm 0,03) C_{\text{Método de comparação}} (\mu\text{mol L}^{-1})$ ,  $r=0,9984$ ) e por aplicação do teste  $t$  de Student ( $t$  calculado 0,53 e 0,33 para GSH total e GSSG;  $t$  tabelado 2,16). Ambos os testes confirmaram a concordância entre os dois métodos, para um nível de confiança de 95 %.

### **3.4. Conclusões**

A metodologia desenvolvida permitiu quantificar a GSH total e a GSSG em amostras de sangue humano, com resultados comparáveis aos obtidos pela metodologia convencional de comparação, com recurso a reduzidos volume de amostra biológica e consumo de enzima. Além disso, a implementação do procedimento de diluição em linha tornou a metodologia muito versátil, permitindo que pudessem ser determinadas concentrações distintas de GSH e GSSG, uma vez que podiam ser obtidos diferentes factores de diluição através de uma simples mudança de tempo numa etapa do ciclo analítico (Etapa D2, Tabela 3.2.). Desta forma, o largo intervalo de concentrações determináveis é conseguido introduzindo a amostra directamente no sistema, após o processamento referido na secção 3.2.2. Muitas vezes este tipo de tratamento (etapa de diluição) acontece numa fase anterior à introdução da amostra no sistema, o que se traduz geralmente numa diminuição do ritmo de amostragem e num aumento considerável da possibilidade de ocorrerem erros durante a manipulação da amostra.

Comparando as duas metodologias, pode-se afirmar que com a metodologia SIA o método é mais rápido, já que a metodologia convencional de comparação inclui um período de incubação de 5 minutos e um de 3 minutos de leitura cinética, mais o tempo consumido na adição dos reagentes às cuvetes. Adicionalmente, o controlo rigoroso do tempo durante cada ensaio é inerente à metodologia de fluxo, o qual é difícil de assegurar quando é efectuada a análise de séries de diferentes amostras pela metodologia de comparação.

Comparando o método desenvolvido com os métodos de determinação da glutatona em amostras biológicas reportados na literatura (Tabela 3.1.), o método automático de SIA usando a reacção de amplificação de Tietze parece ser uma ferramenta alternativa interessante para o efeito. Neste sentido, o método desenvolvido junta as vantagens do SIA à especificidade conferida pela GR (que constitui um factor importante dada a complexidade da matriz de sangue) e selectividade (no caso da determinação da GSSG, após rápida e eficiente derivatização da GSH com M2VP) derivadas do ensaio de regeneração DTNB-GR utilizado. No caso dos métodos electroquímicos, a selectividade não é assegurada [15] e no caso da ressonância magnética nuclear não há discriminação entre a GSH e GSSG [16]. De facto, a metodologia proposta apresenta um processamento de amostras rápido, dado o tempo reduzido (menos de 1 minuto) de derivatização total da GSH, contrastando com os procedimentos morosos de alguns métodos de HPLC [8]. Por sua vez, os métodos baseados em MEKC não requerem qualquer etapa de derivatização [14], mas os limites de detecção são superiores aos aqui atingidos. Com este sistema SIA, é então possível

determinar de forma exacta as concentrações de GSH e GSSG no sangue, com limites de detecção comparáveis aos obtidos com outros métodos [12]. Adicionalmente, o sistema proposto pode ser aplicado a outras amostras biológicas como plasma ou eritrócitos, após algumas modificações no processamento das amostras.

Por outro lado, dado que algumas portas da válvula selectora de fluidos se encontram disponíveis, seria possível efectuar outras determinações usando a mesma montagem, sem ser necessária grande reconfiguração física do sistema. Desta forma, a determinação da actividade da GR podia ser facilmente implementada, introduzindo um outro tubo de reacção numa das portas disponíveis, utilizando o método colorimétrico adoptado [52]. Alternativamente, poderia ser necessário outro detector, no caso das determinações serem efectuadas espectrofotometricamente a 340 nm, como consequência da medida do consumo de NADPH envolvido na redução da GSSG pela GR [53].

A metodologia proposta preenche assim os requisitos experimentais e clínicos para a determinação directa de GSH total e GSSG em amostras de sangue, permitindo a determinação da razão GSH/GSSG, a qual constitui um indicador útil do stress oxidativo, podendo ser usado para avaliar o “status” redox global do organismo ou mesmo monitorizar a eficácia de estratégias de intervenção com antioxidantes. Esta metodologia pode assim constituir uma escolha para a implementação da avaliação rotineira do teor de glutathiona como alternativa aos métodos discretos de comparação e representar uma importante ferramenta como biomarcador do estado de saúde e/ou risco de doença em humanos.

### **3.5. Referências bibliográficas**

- [1] Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta* 2003 Jul; 333 (1): 19-39.
- [2] Meister A. Metabolism and function of glutathione in coenzymes and cofactors. In: Dolphin D, Poulson R, Avramovic O, editors. *Glutathione-Chemical, Biochemical and Medical Aspects - Part A*. New York: John Wiley & Sons; 1989.
- [3] Akerboom TPM, Sies H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods Enzymol*. New York: Academic Press; 1981. p. 373.
- [4] Baskin SI, Salem H. *Oxidants, Antioxidants and Free Radicals*. Washington: Taylor & Francis; 1997. p. 173–4.
- [5] Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, et al. Blood glutathione disulfide: In vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 2002 May; 48 (5): 742-53.
- [6] Monostori P, Wittmann G, Karg E, Turi S. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *J Chromatogr B* 2009 Oct; 877 (28): 3331-46.
- [7] Iwasaki Y, Saito Y, Nakano Y, Mochizuki K, Sakata O, Ito R, et al. Chromatographic and mass spectrometric analysis of glutathione in biological samples. *J Chromatogr B* 2009 Oct; 877 (28): 3309-17.
- [8] Giustarini D, Dalle-Donne I, Colombo R, Milzani A, Rossi R. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Radic Biol Med* 2003 Dec; 35 (11): 1365-72.
- [9] Sakhi AK, Russnes KM, Smeland S, Blomhoff R, Gundersen TE. Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection. *J Chromatogr A* 2006 Feb; 1104 (1-2): 179-89.

- [10] Steghens JP, Flourie F, Arab K, Collombel C. Fast liquid chromatography-mass spectrometry glutathione measurement in whole blood: micromolar GSSG is a sample preparation artifact. *J Chromatogr B* 2003 Dec; 798 (2): 343-9.
- [11] Harwood DT, Kettle AJ, Brennan S, Winterbourn CC. Simultaneous determination of reduced glutathione, glutathione disulphide and glutathione sulphonamide in cells and physiological fluids by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009 Oct; 877 (28): 3393-9.
- [12] Zhang JY, Hu ZD, Chen XG. Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Talanta* 2005 Feb; 65 (4): 986-90.
- [13] Wang TL, An Y, He HB, Qian D, Cai RL. Simultaneous determination of oxidized and reduced glutathione in eel's (*Monopterus albus*) plasma by transient pseudoisotachopheresis coupled with capillary zone electrophoresis. *J Agric Food Chem* 2008 Jan; 56 (2): 368-73.
- [14] Havel K, Pritts K, Wielgos T. Quantitation of oxidized and reduced glutathione in plasma by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 1999 Aug; 853 (1-2): 215-23.
- [15] Ricci F, Arduini F, Tuta CS, Sozzo U, Moscone D, Amine A, et al. Glutathione amperometric detection based on a thiol-disulfide exchange reaction. *Anal Chim Acta* 2006 Feb; 558 (1-2): 164-70.
- [16] Mason RP, Cha GH, Gorrie GH, Babcock EE, Antich PP. Glutathione in whole blood: a novel determination using double quantum coherence transfer proton NMR spectroscopy *FEBS Lett* 1993 Feb; 318 (1): 30-4.
- [17] Potapenko DI, Bagryanskaya EG, Grigoriev IA, Maksimov AM, Reznikov VA, Platonov VE, et al. Quantitative determination of SH groups using F-19 NMR spectroscopy and disulfide of 2,3,5,6-tetrafluoro-4-mercaptobenzoic acid. *Magn Reson Chem* 2005 Nov; 43 (11): 902-9.
- [18] Guo XF, Wang H, Guo YH, Zhang HS. Selective spectrofluorimetric determination of glutathione in clinical and biological samples using 1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-(2-maleimide)-difluoroboradiaza-s-indacene. *Anal Chim Acta* 2009 Feb; 633 (1): 71-5.

- [19] Wang SJ, Ma HM, Li J, Chen XQ, Bao ZJ, Sun SN. Direct determination of reduced glutathione in biological fluids by Ce(IV)-quinine chemiluminescence. *Talanta* 2006 Oct; 70 (3): 518-21.
- [20] Han HY, He ZK, Zeng YE. Chemiluminescence method for the determination of glutathione in human serum using the Ru(phen)<sub>3</sub>(2+) - KMnO<sub>4</sub> system. *Microchim Acta* 2006 Oct; 155 (3-4): 431-4.
- [21] Cohn VH, Lyle J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal Biochem* 1966 Mar; 14 (3): 434-40.
- [22] Owens CWI, Belcher RV. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem J* 1965 Mar; 94 (3): 705-11.
- [23] Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969 Mar; 27 (3): 502-22.
- [24] Brigelius R, Muckel C, Akerboom TPM, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1983; 32 (17): 2529-34.
- [25] Shaik IH, Mehvar R. Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Anal Bioanal Chem* 2006 May; 385 (1): 105-13.
- [26] Redegeld FAM, Vanopstal MAJ, Houdkamp E, Vanbennekom WP. Determination of glutathione in biological material by flow-injection analysis using an enzymatic recycling reaction. *Anal Biochem* 1988 Nov; 174 (2): 489-95.
- [27] Ensafi AA, Khayamian T, Hasanpour F. Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *J Pharm Biomed Anal* 2008 Sep; 48 (1): 140-4.
- [28] Fairbanks VF, Klee GG. Fundamental of Clinical Chemistry. In: Tietz NW, editor. Philadelphia: Saunders; 1987.
- [29] Ruzicka J, Hansen EH. Flow Injection Analysis. New York: John Wiley and Sons; 1988. p. 301.

- [30] Jones DP, Carlson JL, Samiec PS, Sternberg P, Mody VC, Reed RL, et al. Glutathione measurement in human plasma Evaluation of sample collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC. Clin Chim Acta 1998 Jul; 275 (2): 175-84.
- [31] vanStaden JF, Marshall GD. Operational parameters affecting zone penetration in sequential injection analysis. Process Contr Qual 1992; 3: 251-61.
- [32] Srivastava SK, Beutler E. Accurate measurement of oxidized glutathione content of human, rabbit, and rat red blood cells and tissues. Anal Biochem 1968 Oct; 25 (1-3): 70-6.
- [33] Gubeli T, Christian GD, Ruzicka J. Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. Anal Chem 1991 Nov; 63 (21): 2407-13.
- [34] Akerboom TPM, Sies H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. Methods in Enzymology. New York: Academic Press; 1981. p. 373.
- [35] Mize CE, Langdon RG. Hepatic Glutathione Reductase. J Biol Chem 1962; 237: 1589-95.
- [36] Taljaard RE, van Staden JF. Application of sequential-injection analysis as process analyzers. Lab Robotics Automat 1998; 10 (6): 325-37.
- [37] Anderson ME. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples Methods Enzymol. New York: Academic Press; 1983. p. 548–50.
- [38] Jandl JH. Blood - Textbook of Hematology. Boston: Little, Brown and Company; 1996. p. 298.
- [39] Foley RT, Anderson RC. Spectrophotometric Studies on Complex Formation with Sulfosalicylic Acid. I. With Iron III. J Am Chem Soc 1948; 70 (3): 1195-7.
- [40] Stempak DC, Dallas S, Klein J, Bendayan R, Koren G, Baruchel S. Glutathione stability in whole blood: Effects of various deproteinizing acids. Clin Pharmacol Ther 2000 Feb; 67 (2): PII6.
- [41] Griffith OW. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Anal Biochem 1980; 106 (1): 207-12.



- [42] OxisResearch, inventor Colorimetric Determination of Reduced and Oxidized Glutathione, Bioxytech GSH:GSSG-412 Assay. Portland, United States.
- [43] Richie JP, Skowronski L, Abraham P, Leutzinger Y. Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clin Chem* 1996 Jan; 42 (1): 64-70.
- [44] vanStaden JF, Taljaard RE. On-line dilution with sequential injection analysis: A system for monitoring sulphate in industrial effluents. *Fresen J Anal Chem* 1997 Mar; 357 (6): 577-81.
- [45] Baron A, Guzman M, Ruzicka J, Christian GD. Novel single standard calibration and dilution method performed by the sequential injection technique *Analyst* 1992 Dec; 117 (12): 1839-44.
- [46] Christian GD. Sequential injection analysis for electrochemical measurements and process analysis *Analyst* 1994 Nov; 119 (11): 2309-14.
- [47] Oliveira PCC, Masini JC. Sequential injection determination of chromium(VI) by transient oxidation of brucine with spectrophotometric detection and in-line dilution. *Analyst* 1998 Oct; 123 (10): 2085-90.
- [48] Maskula S, Nyman J, Ivaska A. Titration of strong and weak acids by sequential injection analysis technique. *Talanta* 2000 May; 52 (1): 91-9.
- [49] Silva MSP, da Silva IS, Abate G, Masini JC. Spectrophotometric determination of acid volatile sulfide in river sediments by sequential injection analysis exploiting the methylene blue reaction. *Talanta* 2001 Jan; 53 (4): 843-50.
- [50] Pinto PCAG, Lima JLFC, Saraiva MLCMFS. An enzymatic flow analysis methodology for the determination of nitrates and nitrites in waters. *Int J Environ Anal Chem* 2005 Jan 15; 85 (1): 29-40.
- [51] Jocelyn PC. *Biochemistry of the SH Group*. New York: Academic Press; 1973. p. 10.
- [52] Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* 1988 Dec; 175 (2): 408-13.
- [53] Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. In: Meister A, editor. *Methods Enzymol*. New York: Academic Press; 1985. p. 484-90.



## **CAPÍTULO 4**

---

**Determinação do teor de metanol em  
amostras de biodiesel com extracção  
líquido-líquido por membrana**



## **4.1. Introdução**

No presente trabalho, as enzimas utilizadas foram empregues como reagentes analíticos para a determinação do metanol em amostras de biodiesel. Para o efeito, foi implementado um sistema bienzimático constituído pela álcool oxidase e pela peroxidase, sendo a primeira imobilizada em esferas de vidro alquilaminado.

As amostras de biodiesel de natureza orgânica eram directamente injectadas num fluxo de xileno e após passagem numa unidade de extracção líquido-líquido, o metanol extraído era convertido enzimaticamente em ambiente aquoso, constituído pela solução tampão com pH igual a 7,4 unidades, e monitorizado espectrofotometricamente a 420 nm.

### **4.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a determinação do metanol em amostras de biodiesel**

Devido ao crescente aumento do preço do petróleo e o curto tempo de vida do fuel fóssil conjuntamente com os problemas ambientais inerentes aos fuéis derivados do petróleo, a procura de energias alternativas tem vindo a intensificar-se. Neste contexto, o biodiesel surge como um promissor combustível renovável e biodegradável alternativo aos combustíveis convencionais. O biodiesel é obtido a partir da transesterificação de óleos ou gorduras, de origem animal ou vegetal, com um álcool (por exemplo, metanol) na presença de um catalisador [1, 2].

Tendo em conta o tipo de matéria-prima ou o processo de transesterificação empregues, é de extrema importância que o grau de pureza bem como o tipo de contaminantes presentes no biodiesel devam ser avaliados antes do seu uso. Neste sentido, existem normas europeias, mais propriamente, European Standard EN 14214 [3], que define as especificações e os métodos para avaliação dos diferentes parâmetros de qualidade do biodiesel.

Um dos pontos-chave de controlo de qualidade do biodiesel é o metanol. Por razões de segurança o excesso de metanol resultante do processo de transesterificação tem que ser removido por destilação [4]. O metanol pode influenciar o ponto de fulgor e causar corrosão em peças de alumínio e zinco, bem como a redução do número de cetano e lubricidade do biodiesel. Desta forma, foi estabelecido um limite máximo permitido de metanol em biodiesel pela citada norma europeia, sendo de 0,2% (m/m).

Os métodos analíticos de determinação de metanol em biodiesel estão reportados num artigo de revisão recente [5] e resumem-se essencialmente aos métodos cromatográficos, nomeadamente cromatografia gasosa [4,6], e aos de espectrofotometria

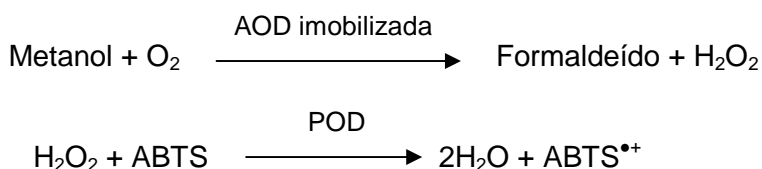
de infravermelho próximo [7, 8]. Os primeiros são laboriosos, implicando derivatização [4] ou uma etapa de extracção [6] prévias, e os segundos implicam o uso da quimiometria na análise dos dados gerados pelo método.

Assim, numa tentativa de ultrapassar as limitações apontadas, foi desenvolvido uma metodologia de fluxo para a determinação de metanol em amostras de biodiesel de uma forma directa, rápida, económica e fiável. Dada a versatilidade oferecida pelas metodologias de fluxo, nomeadamente no que respeita aos procedimentos de manipulação e pré-tratamento de amostra [9], implementou-se uma extracção líquido-líquido dentro do sistema para permitir uma separação selectiva do analito de interesse (metanol) da amostra orgânica complexa. A determinação é feita em meio aquoso e assim o consumo de solventes orgânicos é reduzido. Para tal, a extracção do metanol da fase orgânica (amostra de biodiesel) para a fase aquosa foi efectuada dentro do sistema minimizando o manuseamento da amostra e o consequente risco de contaminação ou perda do analito e por outro lado permitindo automatizar por completo o processamento da amostra, tornando as análises mais rápidas e económicas.

O uso de técnicas de extracção por membrana em sistemas de fluxo constitui uma ferramenta útil para efectuar o pré-tratamento em linha de amostras complexas [10], pois não são necessárias as fases de segmentação e separação integrantes das extracções líquido-líquido convencionais em sistemas de fluxo [11, 12]. As membranas empregues podem ser não porosas, microporosas ou poliméricas, resultando em técnicas de extracção baseadas em duas ou três fases [13]. As aplicações envolvendo extracções de compostos orgânicos de soluções aquosas dadoras para soluções orgânicas aceitadoras [14] são mais comuns, sendo as membranas utilizadas de natureza hidrofóbica. No caso específico da extracção com base em membranas líquidas suportadas (SLM, do inglês "Supported Liquid Membrane"), é a própria fase orgânica que geralmente constitui a interface membrana [15]. Não obstante disso, a extracção por membrana tem também exibido a sua utilidade aquando do manuseamento de amostras orgânicas dadoras. Uma membrana porosa de natureza hidrofóbica foi usada para a separação de herbicidas triazinas dos óleos para a solução aceitadora composta por metanol e água [16]. Por sua vez, foram extraídos e pré-concentrados fenóis de óleos alimentares através da sua passagem numa membrana de natureza hidrofílica, neste caso promovida pela sua conversão em aniões na solução aquosa alcalina aceitadora [17].

No presente trabalho, a determinação do metanol em amostras de biodiesel é então efectuada em meio aquoso após uma extracção líquido-líquido utilizando uma membrana microporosa de natureza hidrofílica que permite a extracção do metanol da fase orgânica dadora para a fase aquosa aceitadora, a qual preenche assim os poros da membrana. O metanol extraído é depois determinado usando um sistema bienzimático

constituído pela álcool oxidase (AOD) imobilizada e pela peroxidase (POD) (Figura 4.1.). O peróxido de hidrogénio, resultante da oxidação do metanol pela acção da AOD, é depois determinado com elevada sensibilidade usando a POD livre em solução e o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), dando origem a um composto de cor verde (catião radical ABTS) monitorizado a 420 nm [18].



**Figura 4.1.** Reacções químicas envolvidas na determinação colorimétrica do metanol pelo sistema bienzimático AOD/POD.

São diversas as abordagens efectuadas pelos diferentes autores no que respeita à utilização das enzimas em sistema de fluxo. Em alguns casos são usadas em solução, noutros imobilizadas em suportes inertes e ainda fazendo parte integrante de sensores ópticos ou electroquímicos [19]. As escolhas efectuadas fundamentam-se nos mais variados aspectos, estando relacionadas com a estabilidade que as enzimas apresentam face a qualquer um dos processos, com a economia da quantidade de enzima, com o tipo de matrizes utilizadas e/ou facilidade de utilização. O processo de imobilização enzimática propriamente dito consiste na confinação da enzima a uma região restrita, garantindo a retenção da actividade catalítica e assegurando a possibilidade da sua utilização de forma repetida. Esta estratégia apresenta algumas vantagens nomeadamente o aumento da estabilidade catalítica da enzima e a possibilidade de sua reutilização, o que consequentemente permite a diminuição do consumo de enzimas dispendiosas, conforme discutido no Capítulo 1. Pode-se contudo, também apontar algumas desvantagens [20], relativamente a este procedimento como sejam a oclusão gradual dos locais activos (com diminuição gradual da actividade enzimática ao longo do tempo) e bloqueamento/contaminação por pequenas partículas presentes nas amostras (por exemplo, no caso de amostras biológicas, determinados componentes complexos poderão provavelmente interferir com a estabilidade da coluna enzimática), ou a compressibilidade do material da coluna que origina um aumento de pressão e uma diminuição do caudal ou mesmo a sua colmatagem. Os caudais adoptados devem neste contexto ter em conta um tempo de contacto suficiente entre as superfícies activas e a

amostra. Além disso, apesar da enzima não se consumir na reacção química, podem surgir perdas físicas de enzima da coluna. Muitos outros factores, como sejam, a contaminação bacteriana, alteração de pH, força iónica, adsorção de interferentes podem contribuir para a rápida desactivação. Por último, o procedimento de imobilização requer pessoal treinado bem como a utilização de reagentes de toxicidade elevada, sendo que este não pode ser aplicado a todas as enzimas.

No trabalho aqui apresentado, empregou-se a POD livre em solução e a AOD imobilizada. A primeira é menos dispendiosa, o volume inserido no sistema era pequeno, definido pelo tempo de activação da válvula de solenóide (cuja solução recirculava em circuito fechado até nova activação), e caso fosse imobilizada, estaria sujeita à passagem contínua do reagente de desenvolvimento de cor que prejudicaria o tempo de vida do reactor enzimático. A segunda foi imobilizada, de forma a aumentar a sua estabilidade catalítica e reutilização, com consequente diminuição do consumo desta enzima dispendiosa.



## 4.2. Material e métodos

### 4.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue na determinação do metanol em amostras de biodiesel era uma solução tampão obtida por dissolução do diidrogenofosfato de potássio (Riedel-de-Haën) numa concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . O pH desta solução era ajustado a 7,4 unidades com uma solução do hidróxido de potássio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Merck).

Para a solução reagente de desenvolvimento de cor, eram preparadas soluções mãe do ABTS (Sigma-Aldrich)  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  e da POD (EC 1.11.1.7, peroxidase proveniente do rábano, do inglês “horseradish peroxidase, HRP”, da espécie *Amoracia rusticana*, do tipo VI-A, com actividade específica de  $1280 \text{ U mg}^{-1}$  de sólido, Sigma-Aldrich)  $2,5 \times 10^6 \text{ U L}^{-1}$ , em solução tampão, as quais eram estáveis ao longo de 1 mês quando armazenadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . As respectivas soluções de trabalho de ABTS ( $0,86 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e POD ( $3 \text{ U mL}^{-1}$ ) eram preparadas diariamente, por diluição apropriada das respectivas soluções mãe na solução tampão, e a solução reagente de desenvolvimento de cor resultante era mantida à temperatura ambiente e protegida da luz no decorrer dos ensaios.

A solução padrão concentrada de metanol (Fisher Scientific) 2% (m/m) e as soluções padrão de trabalho eram preparadas diariamente por diluição rigorosa com o xileno.

As amostras de biodiesel eram de diferentes origens, sendo analisadas de acordo com o método de referência [21].

#### 4.2.1.1. Reagentes usados no processo de imobilização

A AOD (EC 1.1.3.13) da levedura da espécie *Hansenula polymorpha* (Sigma-Aldrich) apresentava uma actividade específica de  $22 \text{ U mg}^{-1}$  de proteína.

As esferas de vidro alquilaminado (AGB, do inglês “aminopropyl glass beads”) usadas no processo de imobilização eram também da marca Sigma e apresentavam granulometrias de 80-120 e 200-400 mesh e um diâmetro médio de poro de  $700 \text{ \AA}$ .

A solução de glutaraldeído a 2,5 % era obtida por diluição da solução de glutaraldeído a 25 % (Sigma-Aldrich) com a solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7,4.

#### 4.2.1.2. Procedimento de imobilização

O procedimento utilizado envolveu numa primeira fase a activação das esferas e numa segunda fase a imobilização propriamente dita [22].

Para a activação das esferas a 2,5 mL da solução de glutaraldeído a 2,5% foram adicionadas 0,125 g de esferas de vidro alquilaminado. Este conjunto foi colocado numa placa de agitação durante uma hora à temperatura ambiente. Durante a primeira hora, de 10 em 10 minutos, fazia-se borbulhar azoto para remover o oxigénio. Finalmente as esferas eram lavadas com água desionizada e solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> com pH 7,4.

Para a imobilização da enzima na superfície das esferas, anteriormente activadas, eram adicionadas 6,4 mg da enzima AOD. O goblé era colocado em gelo durante cerca de 4 horas. Durante a primeira meia hora, e de 10 em 10 minutos, fazia-se igualmente borbulhar azoto. Terminada esta fase realizava-se uma filtração em funil de Buckner e as esferas com a enzima imobilizada eram lavadas sucessivamente com água e solução tampão de fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> com pH 7,4. Após lavagem e filtração as enzimas imobilizadas nas esferas eram armazenadas na solução tampão a 4°C.

O reactor enzimático era obtido por empacotamento de 33 mg AGB-AOD numa coluna de Perspex® (descrita no Capítulo 2), em cujas extremidades se colocaram 2 discos de filtro com diâmetro de poro de 35 µm (Mobicol M1002), de modo a reter as esferas no seu interior. O reactor com as esferas, quando não estava a ser utilizado, era armazenado com solução tampão de fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> com pH 7,4 a 4°C e permanecia estável durante cerca de 2 meses. Deste modo, podiam ser efectuadas cerca de 600 determinações trabalhando de forma contínua com um decréscimo de sensibilidade inferior a 5%.

#### 4.2.2. Aparelhagem

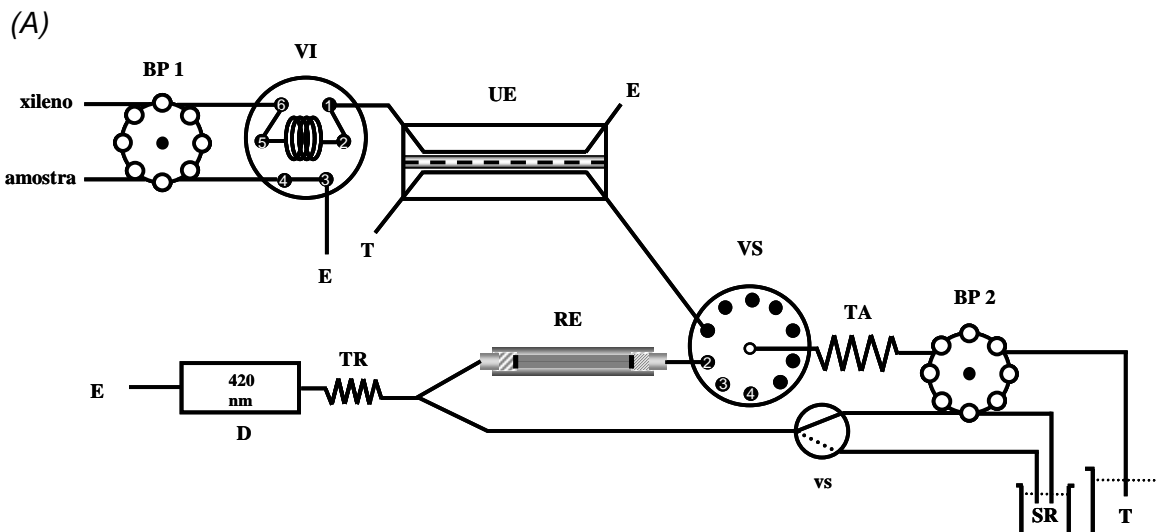
O sistema de fluxo (Figura 4.2.) apresentava como unidades propulsoras 2 bombas peristálticas com tubos de impulsão de PVC (1,30 mm de diâmetro interno) e de fluorelastómero (1 mm de diâmetro interno). Uma das bombas peristálticas permitia a inserção da solução padrão ou amostra de biodiesel no sistema de fluxo, estando conectada a uma das portas da válvula de injeção. A outra bomba permitia o acesso ao tubo de armazenamento e através deste ao canal central da válvula de selecção.

O tubo de armazenamento e o reactor apresentavam comprimentos de 150 e 100 cm, respectivamente, ambos com configuração em figuras de oito.

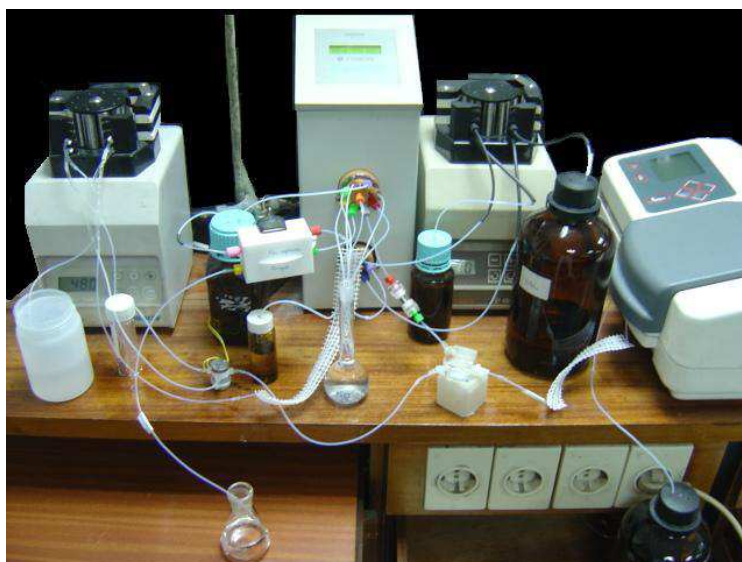
Foi também usada uma unidade de extracção (UE), descrita no Capítulo 2, para permitir a passagem do metanol da amostra orgânica, solução dadora, para a solução tampão aceitadora. O canal superior da UE encontrava-se conectado a uma das portas da válvula de injeção, enquanto que o canal inferior permitia o acesso à coluna enzimática através de uma das portas da válvula selectora. A membrana de extracção

colocada entre as duas cavidades da unidade era obtida a partir dos filtros de membrana da marca Millipore Durapore (ref. SVLP09050). Antes da primeira utilização a membrana de extracção era condicionada em solução tampão.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 4.2.), designadamente, bomba peristáltica, válvulas, espectrofotómetro e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.



(B)

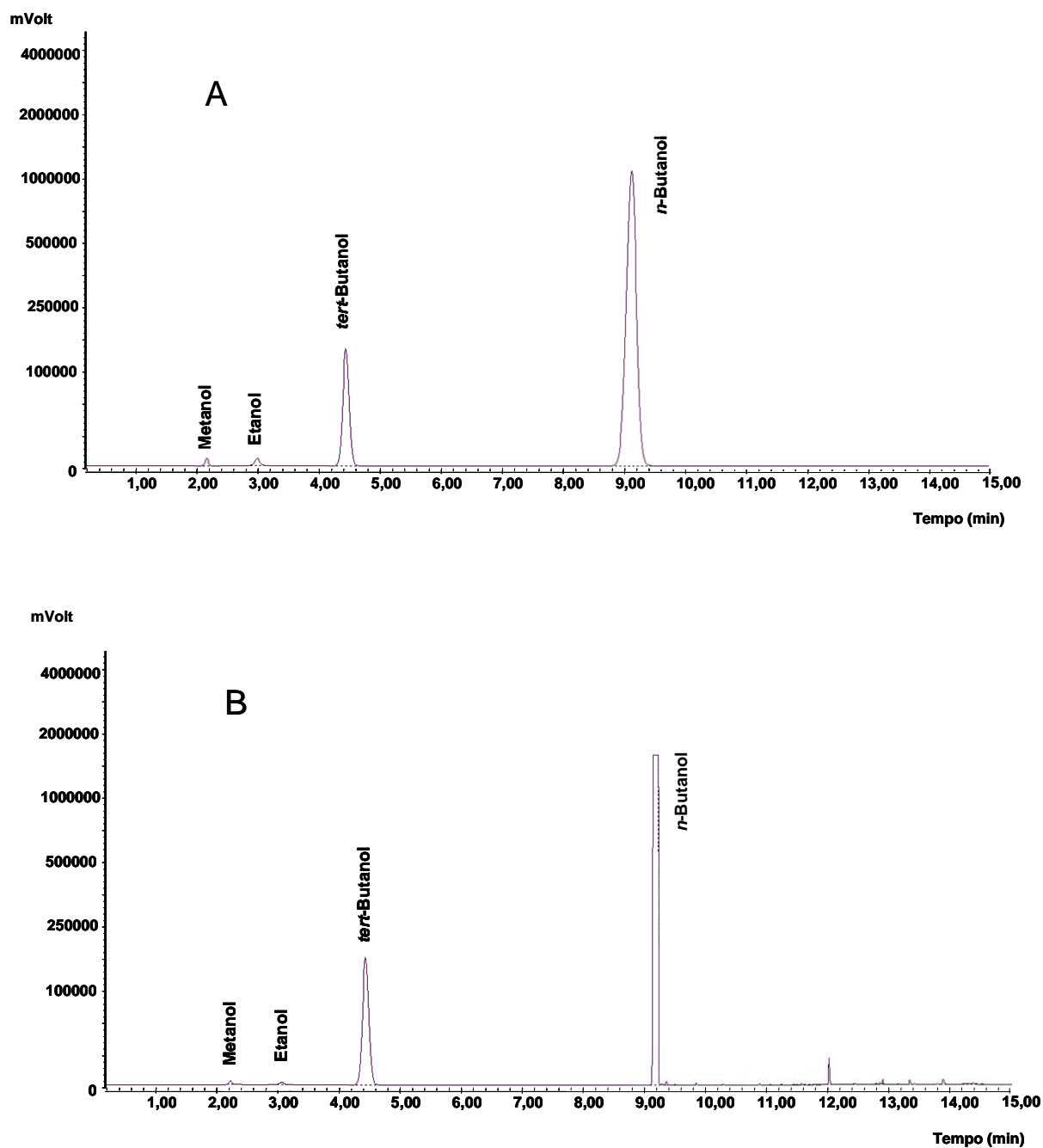


**Figura 4.2.** (A) Esquema do módulo analítico desenvolvido para a determinação do metanol em amostras de biodiesel: **BP1 e BP2** – Bombas peristálticas bidireccionais; **VI** – Válvula de injeção; **UE** – Unidade de extracção; **T** – Solução transportadora de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4; **SR** – Solução reagentes de desenvolvimento de cor (ABTS + POD); **vs** – Válvula solenóide; **TA** – Tubo de armazenamento; **VS** – Válvula selectora de fluidos; **RE** – Reactor enzimático (AOD); **TR** – Tubo de reacção de 100 cm; **D** – Detector espectrofotométrico ( $\lambda = 420$  nm); **E** – Esgoto. (B) Fotografia da montagem desenvolvida.

#### 4.2.3. Metodologia convencional de comparação

O método de referência considerado [21] foi efectuado com o cromatógrafo de gás ThermoFinnigan Trace (Milan, Italy). O instrumento era equipado com um injector do tipo com/sem divisão do fluxo, associado a um detector de ionização por chama de hidrogénio. Para a separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar de sílica fundida (Equity®, Supelco) com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 5 µm de espessura da fase estacionária. O método permitia a quantificação do metanol e/ou etanol presentes no biodiesel e os respectivos padrões eram preparados utilizando o *n*-butanol (Sigma-Aldrich) como solvente. Foi utilizada a técnica de padronização interna e o padrão interno era o *tert*-butanol (Sigma-Aldrich). As amostras de biodiesel foram injectadas pelo menos três vezes e a concentração do componente de interesse (metanol) nas amostras era obtida através da interpolação na curva de calibração obtida com a relação das áreas entre os picos dos padrões de metanol e do padrão interno e as concentrações dos respectivos padrões. Depois era efectuada uma média entre os valores obtidos para as três injeções e era expressa em percentagem mássica (% (m/m)). Cada corrida cromatográfica demorava cerca de uma hora e a unidade de aquisição e processamento de dados do sistema de cromatografia fazia o registo do traçado correspondente ao cromatograma, bem como os tempos de retenção de cada composto detectado e as áreas dos respectivos picos cromatográficos.

Apresenta-se na Figura 4.3. dois cromatogramas obtidos durante os ensaios para uma solução padrão 0,025% (m/m) de metanol e de etanol (A) e para uma amostra de biodiesel proveniente de óleo de girassol e de mamona (B).



**Figura 4.3.** Registos obtidos na análise do teor de metanol em amostras de biodiesel pelo método de cromatografia gasosa: A – Padrão com as concentrações em metanol e etanol de 0,025% (m/m); B – Amostra de biodiesel proveniente de girassol (50%) e mamona (50%). São apenas indicados os picos correspondentes aos compostos de interesse, nomeadamente do metanol, do padrão interno *tert*-butanol e do solvente *n*-butanol.

#### 4.2.4. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para a determinação do metanol em amostras de biodiesel era composto por duas fases: extracção do metanol das amostras de biodiesel e subsequente determinação do mesmo com base no sistema bienzimático (AOD + POD) e no ABTS (Tabela 4.1.).

Assim, no início de cada ciclo o padrão, ou a amostra, eram propulsionados para a UE com o xileno (etapa a), onde ocorria um período de contacto entre a zona de amostra e a membrana de extracção durante 30 segundos por paragem da bomba peristáltica (etapa b), com extracção do metanol para a fase aquosa aceitadora. Posteriormente era bombeado xileno durante 44 segundos para um esgoto secundário (etapa c), com o objectivo de eliminar a amostra presente no canal superior da UE. O metanol extraído era então aspirado para o TA através de umas das portas da válvula selectora (etapa d) e depois, após a inversão do sentido de fluxo, a amostra era transportada na direcção do reactor enzimático até ao tubo de reacção, ocorrendo a conversão do metanol em peróxido de hidrogénio pela AOD (etapa e). Na etapa seguinte, a válvula solenóide era activada permitindo a mistura em confluência da solução reagente de desenvolvimento de cor com o peróxido de hidrogénio obtido (etapa f), formando-se o catião radical  $ABTS^{•+}$ , o qual era determinado espectrofotometricamente a 420 nm (etapa g). O ciclo terminava com a renovação da solução aquosa aceitadora da UE por propulsão da solução tampão transportadora (etapa h).

**Tabela 4.1.** Protocolo analítico para a determinação do metanol em amostras de biodiesel

Etapa	Posição		Tempo(s)	Caudal (mL min <sup>-1</sup> )	Direcção <sup>a</sup>		Posição da válvula solenóide	Descrição
	Válvula de selecção	Válvula de injeção <sup>b</sup>			BP 1	BP 2		
a	1	I	16	0,7	P	-	Off	Propulsão da amostra/padrão para a unidade de extracção com o xileno
b	1	I	30	-	-	-	Off	Período de paragem de fluxo da solução dadora na unidade de extracção
c	1	I	44	0,7	P	-	Off	Propulsão do segmento de amostra/padrão através da unidade de extracção para um esgoto secundário
d	1	E	3,75 9,38	0,8	-	A	Off	Aspiração de 50 µL ou 125 µL da solução aquosa aceitadora para o TA
e	2	E	20	1,0	A	P	Off	Propulsão da alíquota aspirada em direcção ao reactor enzimático com o tampão e enchimento da alça de amostra
f	2	E	12	1,0 + 1,0	-	P	On	Mistura da solução reagente com o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> formado
g	2	E	100	1,0	-	P	Off	Propulsão da mistura reaccional em direcção ao detector
h	1	E	50	1,0	-	P	Off	Renovação da solução aquosa aceitadora por propulsão da solução transportadora

<sup>a</sup> I: injeção; E: enchimento

<sup>b</sup> A: aspiração; P: propulsão

### **4.3. Resultados e sua discussão**

#### **4.3.1. Optimização do sistema**

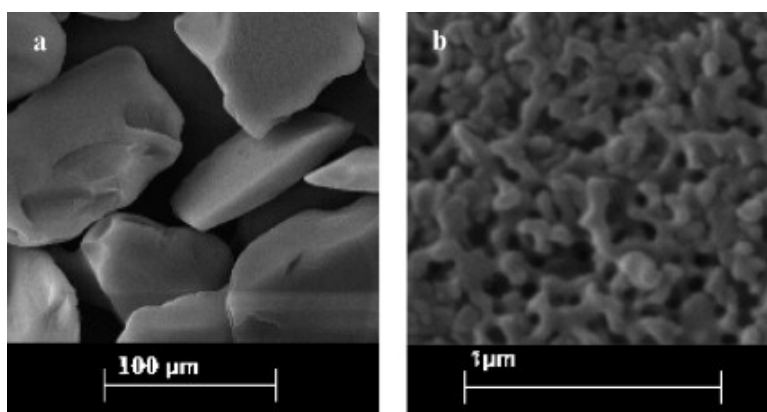
A optimização do sistema propriamente dita foi dividida em duas partes:

- a) optimização da determinação bienzimática do metanol e
- b) optimização da extracção do metanol das amostras de biodiesel com recurso à unidade de extracção membranar.

A AOD foi então usada imobilizada em esferas de vidro e o peróxido de hidrogénio formado era misturado com a POD e o ABTS em solução, numa confluência em “Y”, a caminho do detector, de forma semelhante ao reportado por Peña et al. [23]. O uso da POD e do ABTS garante a sensibilidade necessária à determinação de baixos teores de peróxido de hidrogénio formados [18]. O reactor enzimático situava-se entre a válvula e o detector, mesmo antes da confluência (Figura 4.2.). A técnica de imobilização usada foi a ligação a um suporte inerte, na qual a enzima é retida à superfície de um sólido mediante interacções estabelecidas entre a matriz e enzima, particularmente por ligação covalente entre os resíduos de aminoácidos da enzima e os grupos reactivos do suporte [24]. Este tipo de imobilização é apropriado para reactores de fluxo contínuo, pois oferece uma imobilização forte e estável [25] contrariamente à imobilização não covalente. Esta última baseia-se numa interacção física (simples adsorção) não específica entre a enzima e a superfície do suporte e como tal as preparações enzimáticas resultantes podem ser susceptíveis ao fluxo contínuo. Por outro lado, a imobilização covalente tem a vantagem de permitir a exposição dos grupos reactivos à superfície da enzima [24].

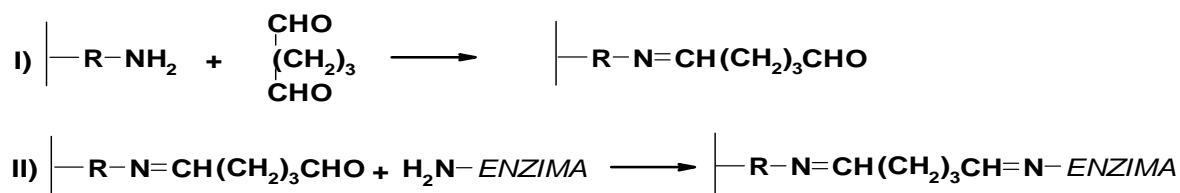
Efectivamente, o recurso à imobilização em suportes sólidos oferece várias vantagens relativamente à sua utilização em meio homogéneo, como sendo: controlo preciso da extensão da reacção, fácil separação dos reagentes e dos produtos formados e reutilização da enzima com consequente diminuição de custos. Adicionalmente, o facto da conversão do substrato se verificar na interface sólido-líquido, onde a concentração da enzima é mais elevada, conduz a um rendimento superior e a limites de detecção mais baixos, necessários para a determinação dos teores de metanol nas amostras de biodiesel.

No processo de imobilização da AOD, foram utilizadas como suporte as esferas de vidro alquilaminado [26], cuja morfologia da superfície se apresenta na Figura 4.4., e o glutaraldeído como agente de activação destas últimas [24], os quais constituem o método mais popular de imobilização covalente de enzimas.



**Figura 4.4.** Imagens obtidas por microscopia electrónica de varrimento da morfologia da superfície das esferas de vidro alquilaminado [27]: (a) AGB 200x, (b) AGB 30,000x. Copyright 2009 Elsevier Science Publishers.

O procedimento de imobilização (descrito em 4.2.1.2.) utilizado envolveu numa primeira fase a activação das esferas com o glutaraldeído e numa segunda fase a imobilização propriamente dita, de acordo com a Figura 4.5.



**Figura 4.5.** Etapas do procedimento de imobilização envolvendo as esferas de vidro alquilaminado e o glutaraldeído.

Procedeu-se então à optimização das condições de empacotamento da coluna com a enzima imobilizada, tendo em conta os principais factores que afectam a eficiência da conversão enzimática, designadamente o tamanho das partículas do suporte, o coeficiente de difusão do substrato e a quantidade de enzima presente, os quais condicionam a resistência interna à transferência do substrato/produto propriamente dito [28]. A eficiência do efeito catalítico da enzima depende do número de moléculas de catalisador aprisionadas e da capacidade do analito de atingir os locais activos [29]. Para o primeiro, de forma a aumentar a eficiência de imobilização da AOD, foram efectuados



alguns ensaios sobre a influência do tamanho das AGB e observou-se um ganho de sensibilidade de cerca de 20% com as partículas 80-120 mesh, comparativamente às de 200-400 mesh. Para o segundo e considerando a difusão o mecanismo de interacção entre as moléculas de substrato e a matriz insolúvel contendo a enzima [30], foi estudada a influência do empacotamento da AOD no reactor na actividade enzimática de forma a melhorar o acesso aos locais activos disponíveis do biocatalisador imobilizado aquando da passagem do substrato. Foi, no entanto, verificado um decréscimo da sensibilidade com uma câmara com agitação com 400  $\mu\text{L}$  (Figura 2.6., Capítulo 2), comparativamente aos reactores convencionais empacotados com enzima (Figura 2.5., Capítulo 2). Apesar de se conseguir um movimento aleatório das partículas com a agitação e consequentemente um aumento da probabilidade do substrato penetrar nos poros das AGB, o elevado volume morto da câmara conduziu a uma maior dispersão da amostra, com uma diminuição acentuada do sinal analítico (78%). Assim, nos estudos subsequentes, foram utilizados reactores convencionais e AGB com granulometria de 80-120 mesh.

Foi, posteriormente, avaliada a quantidade de esferas de vidro activado com enzima imobilizada (AGB-AOD), entre 30 e 120 mg, para o intervalo de concentrações de metanol estudado e escolheu-se uma quantidade baixa de enzima (33 mg AGB-AOD) e decidiu-se variar o volume de solução aquosa aceitadora aspirado para o TA de forma a aumentar a sensibilidade do método.

Seguidamente, foi estudado o caudal de propulsão do transportador, o qual influencia o tempo de residência da amostra no reactor enzimático e consequente formação de peróxido de hidrogénio, bem como a dispersão da zona de reacção no percurso até ao detector. A velocidade de formação do produto é controlada pela transferência do substrato para a superfície e difusão através do vidro poroso para os locais activos da coluna enzimática [31]. Por outro lado, a dispersão que ocorre no reactor enzimático, que condiciona a eficiência de conversão, tem que ser minimizada e para tal, além do próprio empacotamento e da diminuição do diâmetro das partículas do suporte, concorre a velocidade do fluido [28]. Seleccionou-se, desta forma, para o caudal da solução de transporte, no intervalo entre 0,5 e 1,5  $\text{mL min}^{-1}$ , o valor de 1,0  $\text{mL min}^{-1}$  como um compromisso entre o ritmo de amostragem e a sensibilidade. Para valores superiores o decréscimo de sensibilidade era de 30 %.

Relativamente ao volume inserido de solução reagente de desenvolvimento de cor, composta pelo ABTS e POD, este era determinado pelo tempo de activação da válvula solenóide (vs, Figura 4.2.), uma vez que o caudal já se encontrava definido (1,0  $\text{mL min}^{-1}$ ). Foram avaliados volumes de solução reagente entre 50 e 200  $\mu\text{L}$ , conjuntamente com o tempo do ciclo analítico da etapa e (Tabela 4.1.), da propulsão da

alíquota aspirada da UE em direcção ao reactor enzimático, de forma a assegurar uma completa mistura com a zona da amostra. Foi então seleccionado um volume de 200  $\mu\text{L}$ , tendo em conta a magnitude e a diferença dos sinais analíticos obtidos para os padrões de metanol, o qual era inserido no tubo de reacção 20 segundos após a propulsão da zona da amostra através do reactor enzimático. Com este tempo, era assegurada uma sobreposição efectiva das duas zonas confirmada pela forma e altura dos sinais analíticos.

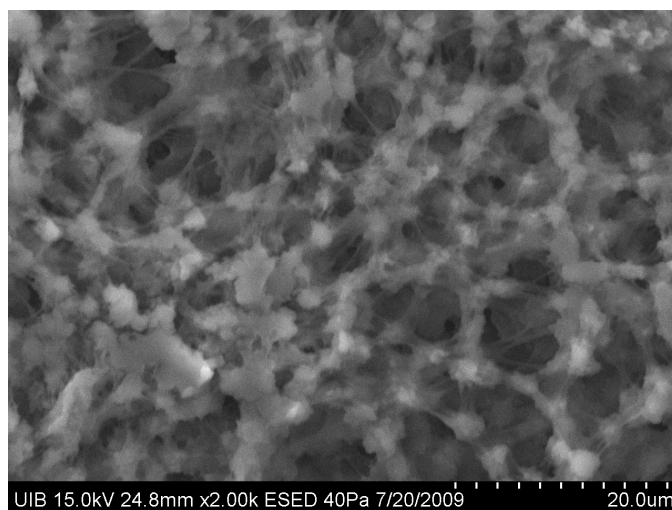
No que se refere à optimização da extracção do metanol das amostras de biodiesel, o primeiro passo consistiu na optimização da estratégia de amostragem, para a injeção directa das amostras de biodiesel no sistema sem qualquer necessidade de pré-tratamento. Para o efeito, foram incorporadas uma válvula de injeção (VI, Figura 4.2.) e uma unidade de extracção (UE, Figura 4.2.), para além de uma bomba peristáltica adicional. Esta última permitia a limpeza e o enchimento da alça de amostra, ao mesmo tempo que a alíquota aspirada da UE era propulsionada em direcção ao reactor enzimático no sistema principal com a BP2 (Etapa e, Tabela 4.1.).

Num segundo passo, após o estabelecimento da configuração do sistema de fluxo, foram elaborados vários estudos tendo como objectivo a escolha do solvente orgânico mais apropriado, a geometria do canal da unidade de extracção, o tipo de membrana, o volume de injeção da amostra, o volume de tampão aspirado do canal aceitador da câmara de extracção bem como o tempo de paragem de escoamento na referida unidade (período de contacto).

A elevada viscosidade das amostras afectava negativamente a taxa de extracção do metanol. Deste modo era importante dissolver as amostras num solvente que reduzisse a viscosidade da solução dadora. Os primeiros ensaios foram realizados usando o n-hexano como transportador, mas com este solvente os teores de metanol obtidos eram inferiores às quantidades adicionadas às amostras de biodiesel. Os estudos seguintes foram efectuados com outros solventes, tais como acetato de etilo, éter petróleo e éter dietílico, mas estes provocavam uma constante introdução de bolhas no sistema de fluxo dada a sua alta volatilidade bem como a deterioração da membrana de extracção. Finalmente, testou-se o xileno como solução transportadora das amostras de biodiesel e com ele foram ultrapassadas as limitações anteriormente apontadas, justificando o seu uso.

A membrana de extracção a usar deve ser mecanicamente estável e de fácil manuseamento. Foram usadas dois tipos de membrana: uma de fluoreto de polivinilileno (PVDF) de natureza hidrofílica e outra de PTFE de natureza hidrofóbica. Com a membrana de teflon, verificou-se contaminação da solução aceitadora com gotas de solvente orgânico e como tal foi seleccionada a membrana microporosa de PVDF

(Figura 4.6.). Esta última era condicionada na solução aquosa aceitadora (solução tampão) e tendo em conta a sua natureza hidrofílica não havia solução orgânica na solução aceitadora. Os poros da membrana ficavam assim preenchidos com a solução aquosa e a solução orgânica, imiscível com o solvente aquoso, encontrava-se em contacto com a membrana e como tal era estabelecida uma área de contacto interfacial na superfície da membrana onde o processo de extracção ocorria. O material que constituía a unidade de extracção era PTFE dada a sua inércia química e resistência aos diferentes solventes orgânicos. A membrana era cortada, condicionada em solução tampão e depois colocada entre os dois paralelepípedos impressos (Figura 2.4., Capítulo 2), sendo sempre substituída quando se verificasse um decréscimo de sensibilidade superior a 5%.



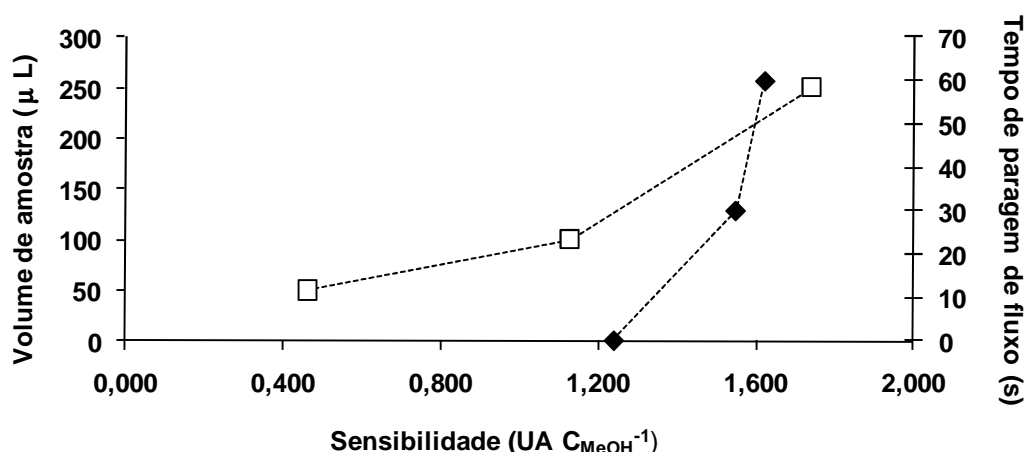
**Figura 4.6.** Imagem obtida por microscopia electrónica de varrimento do filtro de membrana de PVFD, onde se podem observar os microporos da mesma.

Em sistemas de fluxo que recorrem à extracção, sem as etapas de segmentação e separação, o tempo de contacto entre os fluxos dador e aceitador é controlado pela geometria do canal das unidades de extracção e pelo caudal de ambas as soluções [14]. Deste modo, avaliou-se a eficiência de diferentes unidades de extracção que apresentavam cavidades com configurações e dimensões diferentes, através do estabelecimento de curvas de calibração para padrões de metanol até 0,300% (m/m): (A) canal de configuração linear com uma área de superfície de 72 mm<sup>2</sup>; (B) canais de configuração em formas de “U” com áreas de superfície 184 mm<sup>2</sup> e (C) e de 322 mm<sup>2</sup>. Os resultados denotam um aumento de sensibilidade com a área de superfície. A configuração alongada em formas de “U” apresentada pelas unidades B e C permite uma

maior taxa de transferência de metanol para a solução aquosa aceitadora. Por seu turno, a unidade C, com maior área de superfície, proporcionou a sensibilidade mais elevada (cerca de 90% superior que com a unidade A e 52% que a unidade B), tendo sido escolhida para os ensaios seguintes.

O volume de amostra é um dos parâmetros que mais condicionou o desenvolvimento da metodologia quer em termos de estratégia de amostragem quer em termos da sensibilidade do método. Um factor relevante que pode prejudicar a eficiência das unidades de extracção é a pressão. Como forma de prevenir derrames ou fugas de um dos lados da membrana, a pressão do canal dador (superior) e aceitador (inferior) bem como a diferença de pressão sobre a membrana devem ser bastante reduzidas. Neste caso, é especialmente importante manter a pressão do canal aceitador o menor possível, pois a fase aquosa pode facilmente ser impelida dos poros da membrana hidrofílica. Por outro lado, a viscosidade inerente às amostras de biodiesel pode conduzir a diferenças de pressão e afectar a taxa de transferência do analito através do módulo de separação [32]. Desta forma o volume de amostra de biodiesel a inserir deve-se dispersar no transportador (xileno). Os volumes de amostra foram estudados entre 50 e 250  $\mu\text{L}$  (Figura 4.7.) e apesar do aumento concomitante dos sinais analíticos com o volume de amostra, foi escolhido um volume igual a 100  $\mu\text{L}$ , para garantir total homogeneização da amostra no transportador e consequente minimização do fluxo hidrodinâmico dos líquidos através da membrana.

Para incrementar a eficiência de extracção, foi efectuada uma paragem de escoamento na UE. O fluxo da solução dadora contendo a amostra homogeneizada era parado na unidade de extracção por períodos de 30 e 60 segundos. Os resultados obtidos demonstraram que a sensibilidade aumentava cerca de 25% entre 0 e 30 segundos de paragem de fluxo e cerca de 5% entre 30 e 60 segundos (Figura 4.7.). Desta forma, foram adoptados 30 segundos como o tempo de paragem de fluxo, apesar da perda de linearidade até à concentração de 0,500% (m/m).

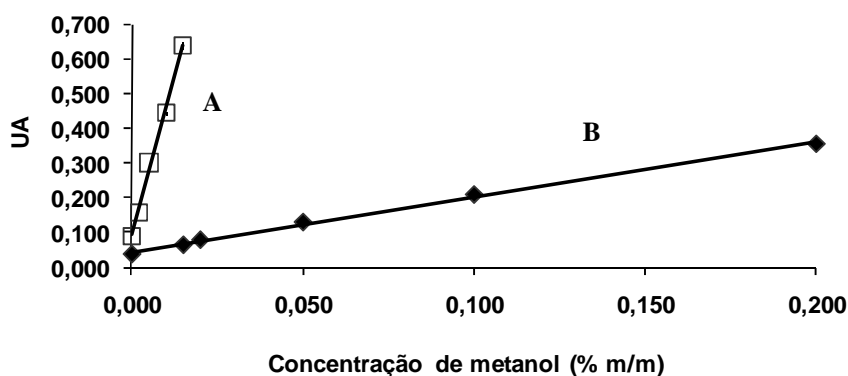


**Figura 4.7.** Variação da sensibilidade do método com o volume de amostra (□) e o período de paragem do fluxo (◆). Condições: aspiração de 50 μL de solução aquosa aceitadora.

A fracção da solução aquosa aceitadora que permanecia em contacto com a membrana de extracção, durante o período de paragem da bomba peristáltica, era depois aspirada para o TA. A variação deste volume permitiu definir dois intervalos de resposta linear. Assim, dos volumes estudados entre 50 e 200 μL, para 50 μL obtinha-se um intervalo de resposta linear até 0,200% (m/m) e com 125 μL o intervalo de resposta linear era até 0,015% (m/m). Para volumes superiores de solução aquosa aceitadora, o sinal analítico obtido para os padrões de metanol mais concentrados era constante e portanto seria necessário aumentar as concentrações quer de enzima quer da solução reagente de desenvolvimento de cor para a conversão de todo o peróxido de hidrogénio formado.

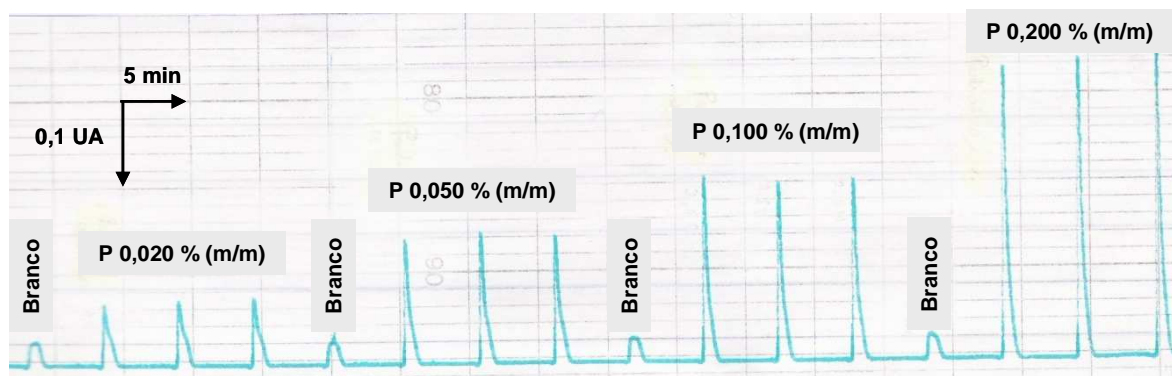
Finalmente, a eficiência de extracção foi calculada comparando os resultados obtidos com a análise do mesmo volume de solução aspirada, do dispositivo de extracção ou de uma das portas laterais da válvula selectora de fluidos. Os sinais obtidos sem a unidade de extracção eram 80% superiores aos obtidos com esta unidade, resultando numa eficiência de separação de 20%.

O sistema assim optimizado viabilizou a obtenção de curvas de calibração ( $\text{Abs (U.A.)} = 36,271 (\pm 1,431) C_{\text{MeOH}} (\% \text{ (m/m)}) + 0,093 (\pm 0,012)$ ,  $R^2=0,9954$ ;  $\text{Abs (U.A.)} = 1,606 (\pm 0,026) C_{\text{MeOH}} (\% \text{ (m/m)}) + 0,039 (\pm 0,002)$ ,  $R^2=0,9989$ ), com intervalo de resposta linear até 0,015% (m/m) (A) e 0,200% (m/m) (B) de metanol, respectivamente (Figura 4.8.).



**Figura 4.8.** Curvas de calibração obtidas correspondentes aos intervalos até 0,015% (m/m) (A) e 0,200% (m/m) (B) de metanol.

Apresenta-se na Figura 4.9. um registo analítico da solução de branco e das soluções de calibração.



**Figura 4.9.** Registo obtido na análise do teor de metanol em amostras de biodiesel. Série de padrões com as concentrações em metanol de 0,020; 0,050; 0,100 e 0,200% (m/m). Em todos os casos procedeu-se à injeção em triplicado.

Foram obtidos limites de detecção de 0,0002% (m/m) e de quantificação de 0,0010% (m/m) para o intervalo de baixos níveis de metanol e valores de 0,007% (m/m) e 0,016% (m/m) para o intervalo de altos níveis, respectivamente.

Neste caso, foram também calculados o limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e a capacidade de detecção ( $CC\beta$ ), descritos no Capítulo 2, ao nível da concentração limite de resíduo máximo estabelecida (0,2% (m/m) de metanol). O  $CC\alpha$  e  $CC\beta$  foram de 0,206% (m/m) e 0,211% (m/m), respectivamente.

Em termos de precisão, foram determinados valores de RSD de 3,5% para amostras de biodiesel com 0,0055% (m/m) de metanol e 4,5% para amostras com 0,0236% (m/m) de metanol, o que denota diferenças não significativas num intervalo alargado de concentrações.

O tempo requerido para completar um ciclo analítico foi de 285 segundos, o que corresponde a cerca de 13 determinações por hora.

#### 4.3.2. Análise das amostras de biodiesel

A metodologia de fluxo desenvolvida e otimizada foi então aplicada na determinação de metanol em amostras de biodiesel de diferentes origens e consequentemente com diferentes composições químicas. De forma a averiguar a exactidão do método desenvolvido, submeteram-se as oito amostras de biodiesel a análise paralela pelo método proposto e pela metodologia de referência [21]. Os resultados encontram-se na Tabela 4.2., onde também se podem analisar os desvios relativos obtidos entre as duas metodologias. Como se pode observar não se verificaram desvios estatisticamente significativos entre os resultados obtidos pela metodologia de fluxo e de referência.

**Tabela 4.2.** Resultados obtidos pela metodologia SIA e pela metodologia de referência para a determinação de metanol em amostras de biodiesel

Amostras	Metodologia SIA	Método de referência	Desvio relativo (%)
	Metanol <sup>a</sup> (% (m/m))	Metanol <sup>a</sup> (% (m/m))	
Soja + Palmoleína	0,0113 ( $\pm$ 0,0002)	0,0117 ( $\pm$ 0,0009)	- 3,42
Colza	0,0231 ( $\pm$ 0,0026)	0,0224 ( $\pm$ 0,0019)	+ 3,13
Girassol	0,0240 ( $\pm$ 0,0006)	0,0234 ( $\pm$ 0,0007)	+ 2,56
Girassol (50%) + Mamona (50%)	0,0344 ( $\pm$ 0,0002)	0,0338 ( $\pm$ 0,0004)	+ 1,78
Soja 1	0,0120 ( $\pm$ 0,0012)	0,0125 ( $\pm$ 0,0004)	- 4,00
Soja 2	0,0183 ( $\pm$ 0,0002)	0,0173 ( $\pm$ 0,0008)	+ 5,78
Soja 3	0,0197 ( $\pm$ 0,0003)	0,0189 ( $\pm$ 0,0007)	+ 4,30
Girassol (80%) + Mamona (20%)	0,0055 ( $\pm$ 0,0002)	0,0063 ( $\pm$ 0,0005)	- 12,01

<sup>a</sup> média e desvio padrão de 3 determinações

Os resultados obtidos por aplicação das metodologias a amostras de biodiesel foram ainda confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear entre as duas metodologias, do tipo  $C_{SIA} (\% (m/m)) = -0,0008 (\pm 0,0011) + 1,0591 (\pm 0,0568) C_{Método de referência} (\% (m/m))$ ,  $r=0,9986$ ) e por aplicação do teste  $t$  de Student ( $t_{calculado} 1,01$ ;  $t_{tabelado} 2,36$ ). Ambos os testes confirmaram a concordância entre os dois métodos, para um nível de confiança de 95 %.



#### **4.4. Conclusões**

A metodologia desenvolvida permitiu quantificar o teor de metanol em amostras de biodiesel e foi obtida uma boa correlação entre os resultados obtidos com esta metodologia e pelo método de referência.

O ritmo de amostragem fornecido pelo sistema desenvolvido é de cerca de 13 determinações por hora, representando uma notável melhoria na eficiência e rapidez quando comparado com o método de referência [21].

Por outro lado, neste sistema, com a inclusão da UE e consequente extracção do metanol da amostra orgânica, a determinação enzimática do analito é efectuada em meio aquoso. Neste caso, a extracção líquido-líquido convencional, com as fases de segmentação e separação, foi então substituída por um procedimento mais simples, de extracção membranar.

A metodologia proposta quando comparada com um procedimento discreto para a determinação do teor de metanol em amostras de gasolina-mistura, que utiliza também a AOD e a POD co-imobilizadas numa matriz polimérica esponjiforme de hidrogel [33], mostra-se claramente vantajosa. Neste último, são consumidas 15 mg de AOD e o tempo de vida operacional do biosensor é limitado a 60 determinações, ao passo que no método proposto apenas são usadas 6,4 mg de AOD e a durabilidade do reactor (período durante o qual não se verificava perda de actividade) era cerca de 2 meses. Para além disso, é também necessária a diluição manual das amostras de fuel com um solvente orgânico antes da sua análise no procedimento discreto. No método proposto, com o procedimento de imobilização covalente da AOD assegurou-se um aumento da sua estabilidade catalítica e a sua utilização de forma repetida, as quais permitiram economizar a quantidade de enzima despendida.

De um modo geral, podemos afirmar que a metodologia baseada em extracção por membrana representa uma importante ferramenta para o controlo de qualidade do biodiesel com potencial aplicação na indústria de energias alternativas, constituindo um método robusto, selectivo e com sensibilidade adequada à análise de amostras orgânicas complexas sem qualquer pré-tratamento.

#### 4.5. Referências bibliográficas

- [1] Knothe G, Dunn RO. In: Gunstone FD, Hamilton RJ, editors. *Oleochemical Manufacture and Applications*. Sheffield (UK): Academic Press; 2001. p. 106-63.
- [2] Dunn RO, Knothe G. Alternative Diesel Fuels from Vegetable Oils and Animal Fats. *J Oleo Sci* 2001; 50: 415-26.
- [3] European Standard EN 14214, CEN—European Committee for Standardization. Brussels, Belgium 2003.
- [4] Mittelbach M, Roth G, Bergmann A. Simultaneous gas chromatographic determination of methanol and free glycerol in biodiesel. *Chromatographia* 1996 Apr; 42 (7-8): 431-4.
- [5] Monteiro MR, Ambrozini ARP, Liao LM, Ferreira AG. Critical review on analytical methods for biodiesel characterization. *Talanta* 2008 Dec; 77 (2): 593-605.
- [6] Paraschivescu MC, Alley EG, French WT, Hernandez R, Armbrust K. Determination of methanol in biodiesel by headspace solid phase microextraction. *Bioresour Technol* 2008 Sep; 99 (13): 5901-5.
- [7] Felizardo P, Baptista P, Menezes JC, Correia MJN. Multivariate near infrared spectroscopy models for predicting methanol and water content in biodiesel. *Anal Chim Acta* 2007 Jul; 595 (1-2): 107-13.
- [8] Felizardo P, Baptista P, Uva MS, Menezes JC, Correia MJN. Monitoring biodiesel fuel quality by near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc* 2007; 15 (2): 97-105.
- [9] Economou A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends Anal Chem* 2005 May; 24 (5): 416-25.
- [10] Jonsson JA, Mathiasson L. Membrane extraction for sample preparation. *Lc Gc Europe* 2003 Oct; 16 (10): 683-9.
- [11] Miro M, Estela JM, Cerda V. Recent advances in on-line solvent extraction exploiting flow injection/sequential injection analysis. *Curr Anal Chem* 2005 Nov; 1 (3): 329-43.
- [12] Silvestre CIC, Santos JLM, Lima JLFC, Zagatto EAG. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Anal Chim Acta* 2009 Oct 12; 652 (1-2): 54-65.

- [13] Jonsson JA, Mathiasson L. Membrane extraction in analytical chemistry. *J Sep Sci* 2001 Aug; 24 (7): 495-507.
- [14] Sahlestrom Y, Karlberg B. An unsegmented extraction system for flow injection analysis *Anal Chim Acta* 1986 Jan; 179: 315-23.
- [15] Sun AL, Li J, Liu RM. High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in natural water coupled with on-line flow injection membrane extraction-preconcentration. *J Sep Sci* 2006 May; 29 (7): 995-1000.
- [16] Martinez RC, Gonzalo ER, Fernandez EH, Mendez JH. Membrane extraction-preconcentration cell coupled on-line to flow-injection and liquid chromatographic systems. Determination of triazines in oils. *Anal Chim Acta* 1995 Apr; 304 (3): 323-32.
- [17] vanStaden JF, Britz HE. In-line flow injection extraction preconcentration through a passive hydrophilic membrane. Determination of total phenols in oil by flow injection analysis. *Fresen J Anal Chem* 1997 Apr; 357 (8): 1066-71.
- [18] Mangos TJ, Haas MJ. Enzymatic determination of methanol with alcohol oxidase, peroxidase, and the chromogen 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) and its application to the determination of the methyl ester content of pectins. *J Agric Food Chem* 1996 Oct; 44 (10): 2977-81.
- [19] Hansen EH. Flow-Injection Enzymatic Assays. *Anal Chim Acta* 1989 Jan 16; 216 (1-2): 257-73.
- [20] Ruzicka J, Hansen EH. Stopped Flow and Merging Zones - New Approach to Enzymatic Assay by Flow Injection Analysis. *Anal Chim Acta* 1979; 106 (2): 207-24.
- [21] Resolução Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis ANP Nº 42 Brazil 2004.
- [22] Masoom M, Townshend A. Determination of Glucose in Blood by Flow-Injection Analysis and an Immobilized Glucose-Oxidase Column. *Anal Chim Acta* 1984; 166 (Dec): 111-8.
- [23] Pena RM, Lima J, Lucia M, Saraiva MFS. Sequential injection analysis-based flow system for the enzymatic determination of aspartame. *Anal Chim Acta* 2004 Jun; 514 (1): 37-43.

- [24] Mottola HA. Enzymatic Preparations in Analytical Continuous-Flow Systems. *Anal Chim Acta* 1983; 145 (Jan): 27-39.
- [25] Bisswanger H. *Practical Enzymology*. Germany: Wiley-VCH; 2004. p. 201-4.
- [26] Estrada P, Baroto W, Castillon MP, Acebal C, Arche R. Temperature Effects on Polyphenol Oxidase Activity in Organic-Solvents with Low Water-Content. *J Chem Technol Biotechnol* 1993; 56 (1): 59-65.
- [27] Alptekin O, Tukul SS, Yildirim D, Alagoz D. Characterization and properties of catalase immobilized onto controlled pore glass and its application in batch and plug-flow type reactors. *J Mol Catal B: Enzym* 2009 Jun; 58 (1-4): 124-31.
- [28] Bowers LD. Applications of immobilized biocatalysts in chemical analysis. *Anal Chem* 1986 Apr; 58 (4): 513A–30A.
- [29] Decastro MDL, Tena MT. Solid interfaces as analytical problem solvers in flow injection analysis. *Talanta* 1993 Jan; 40 (1): 21-36.
- [30] Bowers LD. Immobilized enzymes in chemical analysis *Trends Anal Chem* 1982; 1: 191-8.
- [31] Mottola HA. Enzymes as Analytical Reagents - Substrate Determinations with Soluble and with Immobilized Enzyme Preparations. *Analyst* 1987 Jun; 112 (6): 719-27.
- [32] Risinger L, Johansson G. Effect of sample viscosity on the behavior of thin-channel flow-through dialyzers in flow-injection analysis. *Anal Chim Acta* 1992 May; 261 (1-2): 435-40.
- [33] Wu XJ, Choi MMF. Spongiform immobilization architecture of ionotropy polymer hydrogel coentrapping alcohol oxidase and horseradish peroxidase with octadecylsilica for optical biosensing alcohol in organic solvent. *Anal Chem* 2004 Aug; 76 (15): 4279-85.

## **CAPÍTULO 5**

---

**Avaliação do efeito dos anti-inflamatórios  
não-esteróides sobre a actividade da  
fosfolípase A<sub>2</sub> utilizando lipossomas**



## **5.1. Introdução**

O presente trabalho envolve a utilização de lipossomas como ambiente reaccional para efectuar ensaios com a fosfolípase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) cuja acção decorre na interface lípido-água. A metodologia desenvolvida é baseada na utilização de uma sonda de fluorescência interfacial para a monitorização da mudança do ambiente hidrofóbico em redor da sonda, causada pela reacção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas. Para o efeito, recorreu-se a câmaras de mistura para permitir numa primeira fase a incubação da sonda com os lipossomas e posteriormente da própria PLA<sub>2</sub>. Após o estudo e optimização da actividade enzimática neste ambiente, procedeu-se à avaliação do efeito de diferentes anti-inflamatórios sobre a PLA<sub>2</sub>.

### **5.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a avaliação do efeito dos anti-inflamatórios não-esteróides na actividade da fosfolípase A<sub>2</sub> usando lipossomas como modelos membranares**

A inflamação é um mecanismo essencialmente de defesa dos seres vivos desencadeada por vários tipos de agentes agressores, sendo comum a vários tipos de tecidos [1] e consiste num complexo conjunto de alterações celulares que envolve a activação de enzimas e libertação de diversos mediadores químicos [2]. Dos mediadores intervenientes na reacção inflamatória salientam-se, pela sua importância, os resultantes da síntese das prostaglandinas (PGs). A síntese das PGs é activada, em resposta ao estímulo inflamatório, pela PLA<sub>2</sub> que, actuando sobre fosfolípidos membranares, liberta o ácido araquidónico, que irá ser metabolizado por duas vias diferentes, prosseguindo desta forma a cascata inflamatória.

A PLA<sub>2</sub> (EC 3.1.1.4) é uma enzima largamente distribuída no organismo humano que, pertence à classe das enzimas esterases [3] e hidrolisa os fosfolípidos da membrana na posição éster sn-2 [4]. O resultado é a formação de lisofosfolípidos e de ácidos gordos livres. Actuando desta forma, a PLA<sub>2</sub> está envolvida numa primeira etapa da referida cascata do processo inflamatório, a libertação do ácido araquidónico da membrana celular que induzirá a formação de mediadores pró-inflamatórios [4]. A PLA<sub>2</sub> pode constituir um caminho alternativo no combate de diversas doenças inflamatórias já que esta foi considerada o alvo mais importante da terapia anti-inflamatória [5]. Desta forma, o estudo de inibidores da PLA<sub>2</sub> é de extrema importância, pois estes podem actuar numa fase mais precoce da doença inflamatória em curso.

Encontram-se descritos vários métodos de “screening” de inibidores da actividade da PLA<sub>2</sub> [6-18]. O método por excelência devia aliar sensibilidade e reprodutibilidade

elevadas com a capacidade de monitorizar continuamente a hidrólise dos substratos. Os métodos comumente utilizados nos ensaios das fosfolípases são o método radioactivo de cromatografia em camada delgada (CCD) e o método titulométrico pH-stat [6, 19]. O primeiro é provavelmente o mais exacto e sensível dos métodos disponíveis, mas apresenta várias desvantagens, nomeadamente o facto de só permitir monitorização descontínua, de ser tedioso e dispendioso. Deste modo, o ensaio radioactivo da *E. coli* tornou-se uma alternativa ao ensaio de CCD para fosfolípases de mamíferos não-pancreáticas, sendo menos moroso e dispendioso, mas este não é apropriado para estudos cinéticos rigorosos. O ensaio de pH é frequentemente empregue quando a monitorização do ensaio é contínua, mas a sensibilidade é baixa. No caso de utilização de enzimas purificadas, quando os grupos tióis livres não estão presentes, o ensaio espectrofotométrico do tiol pode ser usado [18]. Este método apresenta uma sensibilidade semelhante ao do método de pH e é mais conveniente e reprodutível, mas usa substratos que não estão disponíveis comercialmente. Desta forma, não obstante dos métodos de determinação disponíveis, a procura de um método conveniente, sensível e contínuo continua. Dos métodos que permitem uma monitorização contínua da actividade da PLA<sub>2</sub>, com sensibilidade elevada, destacam-se os que usam a fluorescência [13].

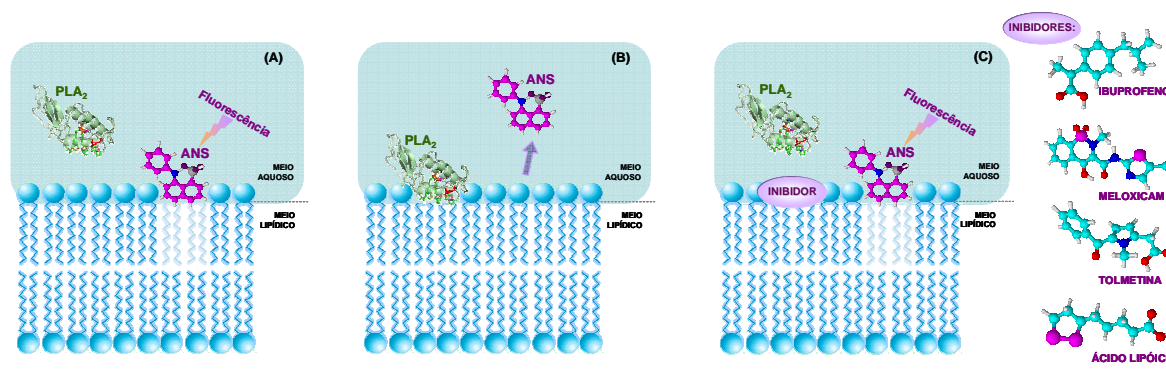
Neste contexto, foi desenvolvido um método que combina a sensibilidade da detecção fluorimétrica, recorrendo à sonda de fluorescência ácido 1-anilinonaftaleno-8-sulfónico (ANS), a monitorização contínua da actividade da PLA<sub>2</sub> e a elevada reprodutibilidade característica dos métodos de fluxo, para a avaliação da potencial inibição dos anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) da actividade da enzima.

A PLA<sub>2</sub>, apesar de ser uma enzima solúvel em água, apresenta uma preferência catalítica para substratos de fosfolípidos agregados, tais como micelas, monocamadas ou lipossomas e funciona optimamente na interface água-fosfolípido [20]. Neste sentido, foram usados lipossomas unilamelares de fosfatidilcolina da gema de ovo (EPC, do inglês “egg yolk phosphatidilcoline”) como substrato para a PLA<sub>2</sub>, pois estes mimetizam o microambiente lipídico fluido e anisotrópico existente nas membranas biológicas. Na realidade, estes fosfolípidos contendo colina, geralmente denominados lecitinas, são os mais abundantes na natureza e os mais usados na preparação de lipossomas [21].

A sonda interfacial ANS, a qual é um indicador sensível de mudanças conformacionais nas membranas apresenta uma elevada intensidade de fluorescência quando ligada às membranas lipídicas (Figura 5.1. A). No entanto, quando a PLA<sub>2</sub> se liga à interface da membrana, esta hidrolisa a ligação sn-2 dos fosfolípidos da membrana originando grupos hidroxilo acídicos de natureza hidrofílica que levam a uma mudança do ambiente em redor da sonda, causando uma diminuição da intensidade de fluorescência



(Figura 5.1. B). Desta forma, se os compostos AINEs estudados forem capazes de inibir a acção da PLA<sub>2</sub>, o ambiente em redor da sonda ANS permanecerá hidrofóbico e a fluorescência da sonda não irá diminuir ou irá sofrer um ligeiro aumento (Figura 5.1. C). É possível assim estudar a actividade da PLA<sub>2</sub> e avaliar o efeito inibitório de alguns AINEs na actividade da mesma.



**Figura 5.1.** Representação esquemática do princípio do ensaio empregue para o estudo da actividade da PLA<sub>2</sub> e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs sobre a PLA<sub>2</sub>.

A interacção fármaco-membrana revela-se um elemento importante na avaliação do(s) mecanismo(s) de acção dos fármacos em estudo e pode também clarificar alguns aspectos inerentes aos mecanismos de toxicidade que a eles se encontram associados. No presente trabalho, prevê-se que os AINEs estudados exerçam uma actividade inibitória sobre a PLA<sub>2</sub>. Contudo, este mecanismo de acção ainda não se encontra completamente descrito. Actualmente sabe-se que uma parte dos inibidores da PLA<sub>2</sub> modificam as propriedades biofísicas das bicamadas fosfolípídicas, condicionando o acesso da enzima aos fosfolípidos e a sua capacidade catalítica, enquanto outra parte poderá ligar-se directamente à enzima e inibi-la alostericamente. Em relação ao segundo mecanismo, está descrito que o ácido  $\alpha$ -lipóico (ALA) inibe directamente a PLA<sub>2</sub> [22], o qual foi usado como controlo positivo para o nosso ensaio. No que respeita aos fármacos, foram testados AINEs representativos de diferentes classes químicas, nomeadamente do ácido arilpropiónico (ibuprofeno), do ácido arilacético (tolmetina) e derivados de oxicamos (meloxicam).

A avaliação do efeito dos AINEs citados sobre a actividade da PLA<sub>2</sub> foi efectuada num sistema de fluxo, cujas características como o controlo rigoroso e preciso da manipulação dos reagentes bem como das condições reaccionais, permitem ultrapassar algumas dificuldades inerentes às metodologias discretas, como sendo a irreprodutibilidade e a morosidade dos ensaios aquando da análise de séries de amostras.

## 5.2. Material e métodos

### 5.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue na avaliação do efeito dos AINEs na actividade da PLA<sub>2</sub> era uma solução tampão preparada com Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris base, Riedel-de-Haën) 10 mmol L<sup>-1</sup>, cloreto de sódio 150 mmol L<sup>-1</sup> e cloreto de cálcio diidratado 1 mmol L<sup>-1</sup> e o pH desta solução era ajustado a 8,9 unidades com uma solução do ácido clorídrico 2 mol L<sup>-1</sup> (Pronalab).

A solução padrão de 1200 µmol L<sup>-1</sup> da sonda ANS (Molecular Probes, Invitrogen) era preparada dissolvendo a quantidade apropriada na solução tampão contendo 1% (v/v) de metanol (Fisher Scientific).

A solução padrão de fosfatidilcolina da gema de ovo (3000 µmol L<sup>-1</sup>, EPC, Sigma-Aldrich) era armazenada em tampão a 4°C.

A solução de fosfolípase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, EC 3.1.1.4, de veneno de abelha da espécie *Apis mellifera*, com actividade específica de 1460 U mg<sup>-1</sup> de proteína, Sigma-Aldrich) de 5 U mL<sup>-1</sup> era igualmente preparada na solução tampão sendo descongelada a 25°C e mantida em gelo durante o seu uso.

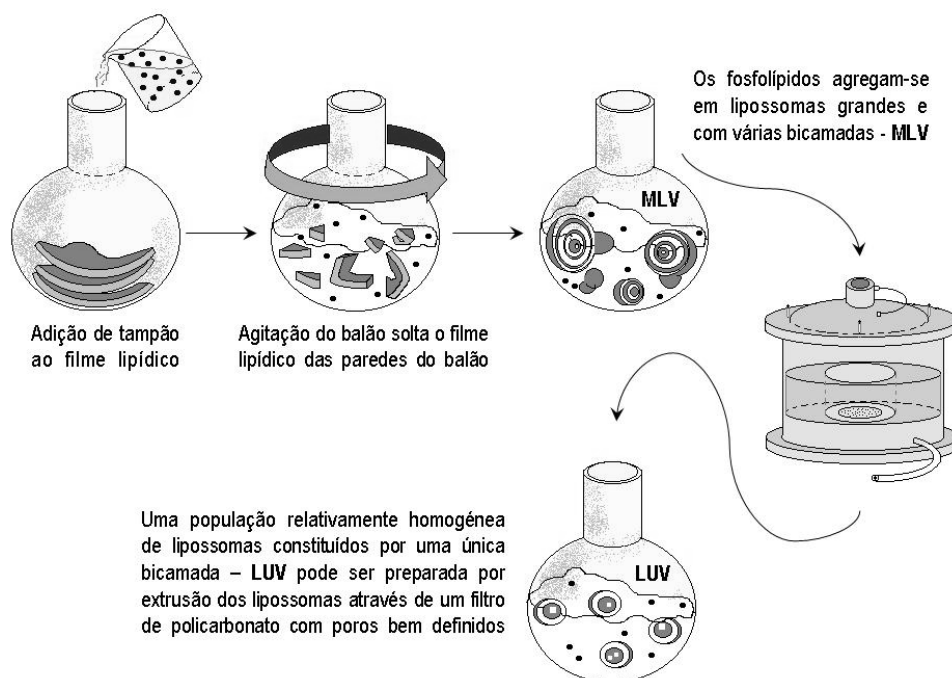
As soluções de trabalho dos anti-inflamatórios não-esteróides (meloxicam, tolmetina e ibuprofeno; Sigma-Aldrich), do ácido α-lipóico (ALA, Fluka), da sonda ANS e do EPC eram preparadas diariamente por diluição adequada das respectivas soluções padrões com a solução tampão.

Todas estas soluções eram protegidas da luz no decorrer dos ensaios.

### 5.2.2. Preparação dos lipossomas

A sua preparação foi feita através do método de hidratação do filme lipídico (Figura 5.2.) [23, 24]. Num primeiro passo o lípido EPC é dissolvido numa mistura de solventes orgânicos, clorofórmio-metanol (9:1) e evaporado em corrente de azoto para remover vestígios dos solventes usados. Num segundo passo, o filme lipídico formado é hidratado com tampão e é agitado em vórtice. Agora a mistura consiste em lipossomas multilamelares (MLVs). Num terceiro passo, os MLVs são extrudidos através de membranas (Nucleopore) com porosidade apropriada, neste caso 100 nm, obtendo-se lipossomas unilamelares (LUVs). Esta extrusão, assim como a hidratação do filme lipídico, foi feita a uma temperatura superior à de transição de fase dos lípidos (neste caso à temperatura ambiente) que vão constituir os LUVs. A concentração de EPC nas suspensões de lipossomas foi determinada pela quantificação do fósforo (uma mole de

fósforo corresponde a uma mole de fosfolípido) pelo método do fosfomolibdato modificado [25].



**Figura 5.2.** Representação esquemática da preparação de MLV e LUV pelo método de hidratação do filme lipídico. Adaptado de [21].

### 5.2.3. Aparelhagem

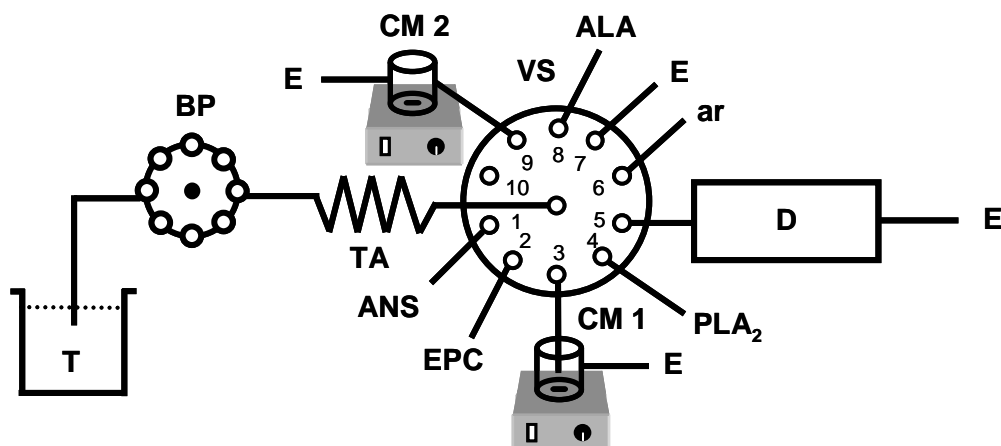
O sistema de fluxo apresentava na unidade propulsora um tubo de impulsão de PVC com 1,30 mm de diâmetro interno.

O tubo de armazenamento apresentava um comprimento de 150 cm com configuração em figuras de oito.

Foram também usadas duas câmaras de mistura, descritas no Capítulo 2, ligadas a duas das portas da válvula selectora e colocadas sobre placas de agitação termostalizadas a 25°C, que apresentavam um volume interno de cerca de 350 µL (incluindo a barra magnética). Este valor foi avaliado por pesagem, através da diferença entre o seu valor quando cheia com a solução de trabalho e quando vazia.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 5.3.), designadamente, bomba peristáltica, válvula selectora de fluidos, fluorímetro e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.

(A)



(B)



**Figura 5.3.** (A) Montagem de fluxo para o estudo da actividade da  $PLA_2$  e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs e do ALA: **T** – Solução transportadora de tampão Tris 10 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,9; **BP** – Bomba peristáltica bidireccional; **TA** – Tubo de armazenamento; **VS** – Válvula selectora de fluidos; **ANS** – Solução de sonda ANS; **EPC** – Solução de lipossomas ou mistura incubada lipossomas-fármaco; **PLA<sub>2</sub>** – Solução de enzima ou mistura incubada enzima-fármaco; **ALA** – Solução de ácido lipóico; **CM 1 e CM 2** – Câmaras de mistura 1 e 2; **D** – Detector fluorimétrico ( $\lambda_{excitação}=377$  nm;  $\lambda_{emissão}=475$  nm); **E** – Esgoto. (B) Fotografia da montagem desenvolvida.

#### **5.2.4. Método discreto de comparação**

A acção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas foi monitorizada com a sonda interfacial ANS por um ensaio de fluorescência no espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B. Todos os ensaios foram efectuados a 25 °C usando uma célula de percurso óptico de 1 cm.

Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram os mesmos que os usados na metodologia de SIA.

Inicialmente, a mistura reaccional constituída por tampão, substrato EPC (50 µmol L<sup>-1</sup>) e ANS (10 µmol L<sup>-1</sup>) era continuamente agitada durante aproximadamente 10 minutos. De seguida, era efectuada a adição da PLA<sub>2</sub> para começar a reacção hidrolítica.

O efeito dos inibidores na acção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> foi estudado com o mesmo ensaio de fluorescência. Foram testados dois tipos de procedimentos de incubação. No primeiro, a solução stock de PLA<sub>2</sub> (5 U mL<sup>-1</sup>) foi incubada com diferentes concentrações de fármacos (0-8 µmol L<sup>-1</sup>) durante 30 minutos e a reacção foi monitorizada após a adição desta mistura incubada à solução stock de EPC (50 µmol L<sup>-1</sup>). No segundo, a solução stock de EPC foi incubada com diferentes concentrações de fármacos (0-8 µmol L<sup>-1</sup>) durante 30 minutos antes da adição da solução stock de PLA<sub>2</sub> (5 U mL<sup>-1</sup>) para iniciar a reacção.

#### **5.2.5. Procedimento experimental**

O procedimento analítico compreendeu o estudo da actividade da PLA<sub>2</sub> e a avaliação do efeito inibitório dos AINEs e do ALA sobre a actividade da PLA<sub>2</sub>. O ciclo analítico resultante está sumariado na Tabela 5.1.

Para o estudo da actividade da PLA<sub>2</sub>, o ciclo analítico inicia-se com a aspiração de uma bolha de ar (etapa a), seguido da aspiração de igual volume de sonda ANS e de substrato EPC (etapas b e c) e nova aspiração de uma bolha de ar (etapa d). Esta sequência, após inversão do sentido de fluxo, era direccionada para a câmara de mistura 1 (CM 1, Figura 5.3.) (etapa e), onde se verificava a incubação dos lipossomas de EPC com a sonda ANS com paragem do fluxo (etapa f). Seguidamente, uma alíquota de PLA<sub>2</sub>, precedida de uma bolha de ar (etapas g e h), era também propulsionada para a CM 1 (etapa i), onde ocorria hidrólise do EPC pela PLA<sub>2</sub> durante o período de permanência na câmara (paragem de fluxo) (etapa j). Depois, era retirada uma alíquota da CM 1 para o TA (etapa k) que finalmente era propulsionada para o detector (etapa l), com aquisição do sinal analítico obtido. O ciclo analítico terminava com a lavagem e esvaziamento da CM 1 (etapas m-o), de modo a que no ciclo seguinte não se encontrassem na câmara vestígios

da mistura reaccional da determinação anterior. A lavagem compreendia uma etapa em que a solução transportadora era propulsionada para a câmara a um caudal elevado, saindo pelo canal de esgoto (etapa m). Na etapa seguinte, procedia-se ao esvaziamento da câmara por aspiração da solução transportadora que permaneceu no seu interior (etapa n). Na etapa o, a solução aspirada da câmara era direccionada para uma porta de esgoto, de modo a garantir que toda a tubagem estivesse preenchida apenas com solução transportadora.

Para a avaliação do potencial efeito inibitório dos fármacos, as soluções de EPC ou de PLA<sub>2</sub> eram pré-incubadas com diferentes concentrações dos fármacos (de forma semelhante ao método discreto de comparação) e as misturas sujeitas a incubação de lipossomas ou enzima com fármacos eram aspiradas em vez dos lipossomas ou da enzima (etapa c ou h, respectivamente).

Para a incubação dentro do sistema do ALA com a enzima foi conectada uma segunda câmara de mistura (CM 2, Figura 5.3.) a uma das portas da válvula selectora. Neste caso particular, o ciclo analítico inicia-se com a aspiração de uma bolha de ar, seguido do ALA e da enzima e de uma segunda bolha de ar (etapas A-D). Esta sequência era depois enviada para a CM 2 (Etapa E). A incubação do EPC com a sonda ANS era efectuada enquanto a incubação do ALA e da enzima decorria na CM 2, uma vez que era efectuada uma paragem de 10 min (Etapa f). De seguida, uma alíquota da mistura em CM 2 (etapa h), precedida de uma bolha de ar, era direccionada para a CM 1 com paragem de fluxo. A partir daqui, o ciclo analítico prosseguia de acordo com o descrito na Tabela 5.1. e terminava com a limpeza da CM 2 com a solução tampão transportadora (etapas M-O), de forma semelhante ao descrito para a CM 1 (etapas m-o).

**Tabela 5.1.** Procedimento analítico para o estudo da actividade da PLA<sub>2</sub> e para a avaliação do efeito inibitório dos AINEs e do ALA usando a metodologia SIA

<b>Etapas</b>	<b>Posição da válvula</b>	<b>Tempo de operação (s)</b>	<b>Caudal (mL min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Descrição</b>
A*	6	1	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
B*	8	5,6	0,8	Aspiração de 75 µL de ALA
C*	4	11,2	0,8	Aspiração de 150 µL de PLA <sub>2</sub>
D*	6	1	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
E*	9	6,8	3,0	Propulsão da sequência para CM 2
a	6	1	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
b	1	5,6	0,8	Aspiração de 75 µL de ANS
c	2	5,6	0,8	Aspiração de 75 µL de EPC (ou da mistura incubada EPC-fármaco)
d	6	1	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
e	3	4,5	3,0	Propulsão da sequência para a CM 1
f	3	300 ou 600*	-	Período de paragem – Incubação 1
g	6	1	0,8	Aspiração de uma bolha de ar
h	4 ou 9	3,8	0,8	Aspiração de 50 µL de PLA <sub>2</sub> (ou da mistura incubada PLA <sub>2</sub> -fármaco) ou da CM 2
i	3	2,5	3,0	Propulsão da sequência para a CM 1
j	3	180	-	Período de paragem – Incubação 2
k	3	15	0,8	Aspiração da mistura da CM 1
l	5	50	2,0	Propulsão da mistura para o detector
m	3	35	3,0	Limpeza da CM 1 com o transportador
n	3	25	3,0	Aspiração do transportador de limpeza da CM 1
o	7	40	3,0	Propulsão do transportador de limpeza para o esgoto
M*	9	35	3,0	Limpeza da CM 2 com o transportador
N*	9	25	3,0	Aspiração do transportador de limpeza da CM 2
O*	7	40	3,0	Propulsão do transportador de limpeza para o esgoto

\* Etapas adicionais quando a incubação do ALA e da PLA<sub>2</sub> é efectuada dentro do sistema.

### 5.3. Resultados e sua discussão

#### 5.3.1. Optimização do sistema

Como a metodologia proposta não se encontrava definida em ensaios discretos, foi imperativo estabelecer numa primeira fase condições em batch para a determinação da actividade da PLA<sub>2</sub> com a ANS e só depois proceder à automatização do ensaio. Desta forma, as condições iniciais utilizadas no método discreto de comparação (secção 5.2.4.) foram transportadas para o sistema de fluxo e depois procedeu-se à optimização das condições óptimas para a operação da montagem SIA.

Dada a versatilidade de operações oferecidas pela válvula selectora de fluidos, foram incorporadas duas câmaras de mistura, descritas no Capítulo 2. A utilização destas em sistemas SIA é vantajosa para a diluição e mistura de soluções muito concentradas ou para garantir uma mistura efectiva entre três ou mais zonas [26]. No presente trabalho, as câmaras de mistura, conectadas às portas laterais da válvula selectora (Figura 5.3.) proporcionavam uma mistura efectiva da solução viscosa dos lipossomas com outros reagentes e possibilitavam a incubação da amostra com os reagentes isolada do resto do sistema, durante a qual o sistema podia acomodar outras etapas do ciclo analítico. O posicionamento da câmara e o modo de funcionamento peculiar dos sistemas SIA, com inversão do sentido do fluxo, facilitaram a criação das condições óptimas para o desenvolvimento da reacção enzimática, ao permitir a aspiração das diferentes zonas de reagentes em diferentes momentos e a sua introdução na câmara de mistura na altura propícia. Foram assim criadas as condições de mistura e incubação adequadas para o desenvolvimento da reacção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas e consequente mudança do ambiente em torno da sonda ANS.

Recorreu-se também à estratégia de fluxo monosegmentado [27], que se caracteriza pela aspiração da zona reaccional entre duas bolhas de ar, o que se traduz numa redução da dispersão e consequentemente num aumento da sensibilidade da determinação. Optou-se assim por aspirar as zonas correspondentes à sonda ANS e ao EPC e mais tarde à enzima PLA<sub>2</sub> entre duas bolhas de ar antes da entrada na câmara de mistura, garantindo assim a sua individualidade e limitando a sua dispersão no transportador. O fluxo era depois parado após a entrada da segunda bolha de ar na câmara permitindo a incubação da sonda com os lipossomas e a enzima. Efectivamente, intercalando as zonas dos reagentes envolvidos entre duas bolhas de ar, era possível mantê-las separadas das restantes zonas e misturá-las apenas na câmara de mistura, evitando uma diluição excessiva destes com o transportador quer no TA quer na própria câmara de mistura. Por outro lado, era possível controlar, através do movimento da



primeira bolha aspirada, o percurso das zonas aspiradas para a câmara de mistura, o que permitia um controlo rigoroso do tempo necessário para introduzir todas as zonas na câmara, sem dispersão adicional devido à entrada de transportador. Devido ao facto de a câmara de mistura se encontrar conectada ao sistema através de um dos seus orifícios laterais (conforme descrito no Capítulo 2, Secção 2.3.), encontrando-se o outro fechado, as bolhas de ar, ao entrarem na câmara de mistura, eram de imediato expelidas pelo canal de esgoto superior, não afectando a repetibilidade dos sinais analíticos obtidos.

Os primeiros estudos com esta montagem foram efectuados utilizando a sequência de adição de reagentes adoptada no ensaio discreto, uma vez que esta garantia a mistura da sonda com o EPC antes da adição da PLA<sub>2</sub>. Neste sentido, o sinal de branco, considerado 100%, era obtido pela incubação da sonda ANS com os lipossomas. Por sua vez, o sinal obtido após a adição da PLA<sub>2</sub> à anterior mistura incubada era considerado como correspondendo a uma percentagem relativa, permitindo em último caso a determinação da actividade da PLA<sub>2</sub>.

A montagem SIA foi então optimizada com o objectivo de se estabelecerem as concentrações óptimas de substrato EPC, de sonda e de enzima bem como os tempos de incubação (ou tempos de residência dentro da câmara) antes e após a adição de PLA<sub>2</sub>. A Tabela 5.2. sumariza as condições seleccionadas para a avaliação da actividade da PLA<sub>2</sub> e subsequente estimação do efeito inibitório dos AINEs sobre esta actividade.

Os factores de dispersão [28] na CM 1 foram determinados utilizando uma solução de quinino 10 mg L<sup>-1</sup> ( $\lambda_{\text{excitação}}=250$  nm;  $\lambda_{\text{emissão}}=450$  nm). Obtiveram-se como factores de dispersão 8,5, 6,5 e 8,0 para as soluções de ANS, EPC e enzima, respectivamente, e as soluções de trabalho correspondentes foram então preparadas com base nestes factores.

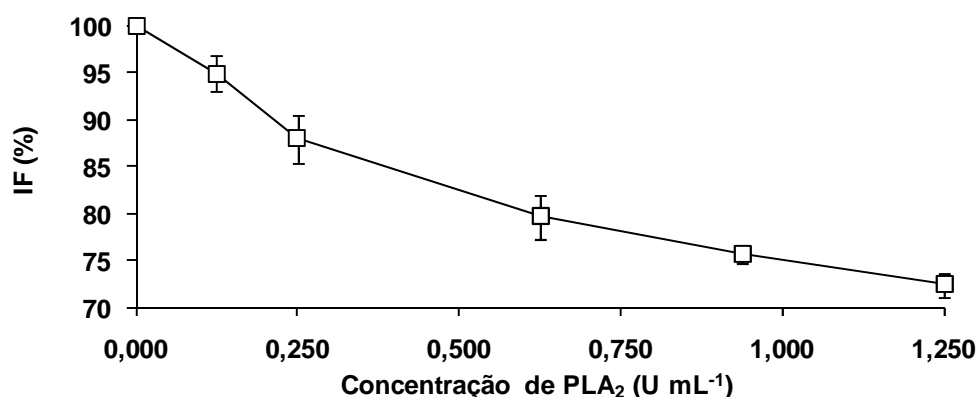
**Tabela 5.2.** Intervalos de valores usados para o estudo dos diferentes parâmetros do sistema e valores seleccionados para a sua operação

Parâmetro	Intervalo estudado	Valor seleccionado
Concentração de EPC ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	25 - 150	50
Concentração de PLA <sub>2</sub> (U mL <sup>-1</sup> )	0,125 - 1,250	0,625
Concentração de ANS ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	5 - 15	10
Período de incubação da ANS com EPC (min)	0 - 10	5
Período de incubação após a adição da PLA <sub>2</sub> (min)	0 - 10	3

Nas experiências realizadas em modo discreto, os tempos de incubação antes e depois da adição da PLA<sub>2</sub> eram de 10 e de 5 min, respectivamente. No que respeita ao sistema SIA, o primeiro tempo de incubação (etapa f, Tabela 5.1.) foi reduzido para 5 min, uma vez que este tempo proporcionava a maior razão sinal analítico/branco. Para o período de incubação após a adição da PLA<sub>2</sub> (etapa j, Tabela 5.1.), foi escolhido um tempo de 3 min, já que a razão sinal analítico/ruído para um tempo de 5 min aumentou apenas cerca de 6 %. Adicionalmente, o caudal de propulsão do transportador em direcção ao detector foi fixado como sendo 2,0 mL min<sup>-1</sup>, dada que a reacção estava completa na CM 1.

A concentração final do substrato EPC foi estudada entre 25 e 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . À medida que a concentração aumenta, há um incremento do sinal de branco, sendo que a diferença entre o branco e o sinal analítico é maior para a concentração de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de EPC, a qual foi escolhida para os ensaios seguintes.

A concentração de enzima foi seguidamente avaliada até 1,250 U mL<sup>-1</sup>. Como se pode ver na Figura 5.4., há um decréscimo da intensidade de fluorescência de cerca de 20% até uma concentração 0,625 U mL<sup>-1</sup> de PLA<sub>2</sub>. Para concentrações superiores, a diminuição foi de apenas cerca de 7%. A concentração de PLA<sub>2</sub> escolhida como óptima foi então 0,625 U mL<sup>-1</sup>, pois a diferença de intensidade de fluorescência obtida não justifica um aumento da quantidade de enzima em 50% e a precisão dos ensaios ronda os 2%.



**Figura 5.4.** Influência da concentração de PLA<sub>2</sub> no sinal analítico obtido (intensidade de fluorescência em %).

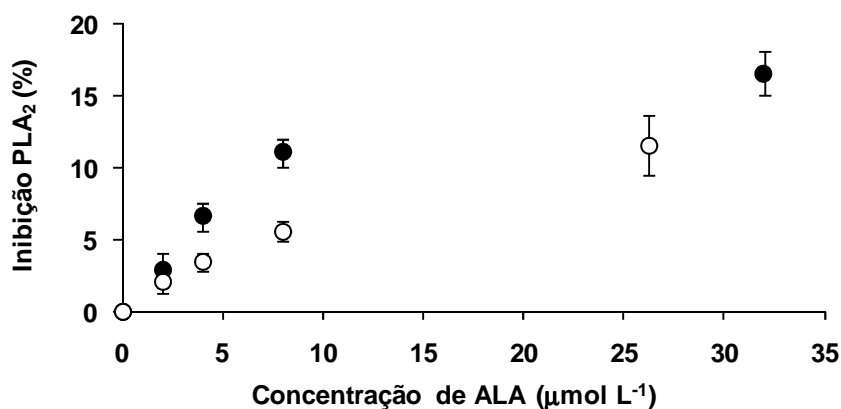
Uma vez estabelecidas as concentrações finais óptimas do substrato lipídico e da enzima (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  EPC e 0,625 U mL<sup>-1</sup> PLA<sub>2</sub>), foi escolhida como óptima uma concentração de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  da sonda ANS entre 5 e 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . É importante salientar que quer o intervalo de concentrações de ANS testado (a razão lípido:sonda foi sempre inferior a 300:1) quer a concentração de metanol utilizada (1%, v/v) para promover a solubilização da sonda não interferem com o ambiente estrutural dos lipossomas [29-32].

### 5.3.2. Aplicação do método desenvolvido para avaliar o efeito inibitório dos AINEs e do ácido lipóico na actividade da PLA<sub>2</sub>

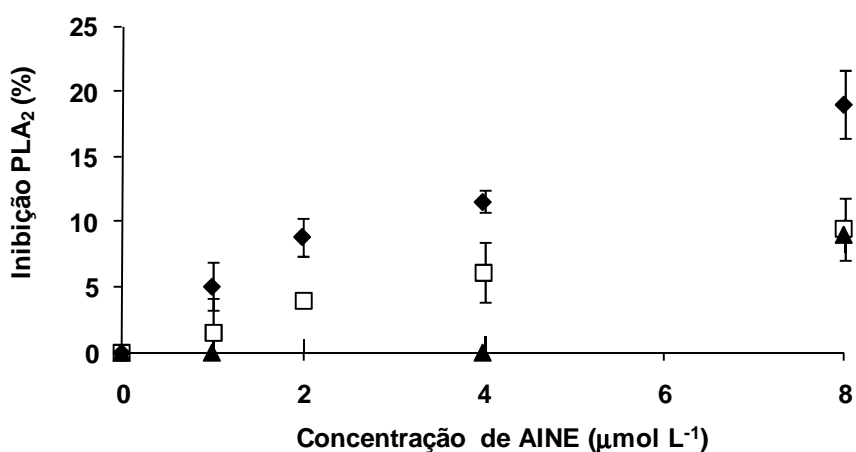
O método otimizado foi então aplicado a AINEs de diferentes classes químicas, designadamente derivados do ácido arilpropiónico (ibuprofeno), do indol (tolmetina) e do oxicam (meloxicam) bem como ao ALA.

Neste caso, o ciclo analítico descrito anteriormente é precedido por dois procedimentos diferentes de incubação, dos fármacos com os lipossomas ou com a PLA<sub>2</sub>, com a duração de 10 minutos, tempo a partir do qual não há melhoria de resultados de acordo com as experiências efectuadas em modo discreto.

As actividades medidas com a mistura fármacos-PLA<sub>2</sub> ou EPC foram consideradas como uma percentagem relativa da actividade da PLA<sub>2</sub> obtida sem os fármacos, a qual corresponde a 0 % de inibição. Assim, a eficiência de inibição da PLA<sub>2</sub> foi expressa como uma percentagem de inibição da acção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas em função da concentração final dos inibidores testados (Figuras 5.5. e 5.6.).



**Figura 5.5.** Avaliação da eficiência de inibição da PLA<sub>2</sub> (%) exibida pelo ALA de acordo com o tipo de incubação: dentro (○) e fora (●) do sistema.



**Figura 5.6.** Avaliação da eficiência de inibição da PLA<sub>2</sub> (%) exibida pelos AINEs testados: tolmetina (◆); meloxicam (□) e ibuprofeno (▲).

No que respeita ao controlo positivo do ensaio, ALA, os resultados obtidos mostram o seu efeito inibitório sobre a PLA<sub>2</sub> apenas quando a incubação é feita com a própria PLA<sub>2</sub>. Estes resultados estão em concordância com os encontrados na literatura [22], apontando para a interacção directa do ALA com a enzima. Como referido anteriormente, foi efectuada a incubação dentro do sistema SIA do ALA com a enzima através da introdução de uma outra câmara de mistura (CM 2, Figura 5.3), tornando a automatização de todo o processo possível e minimizando desta forma o manuseamento da amostra e consequentemente o risco de contaminação ou perda do analito. Foram

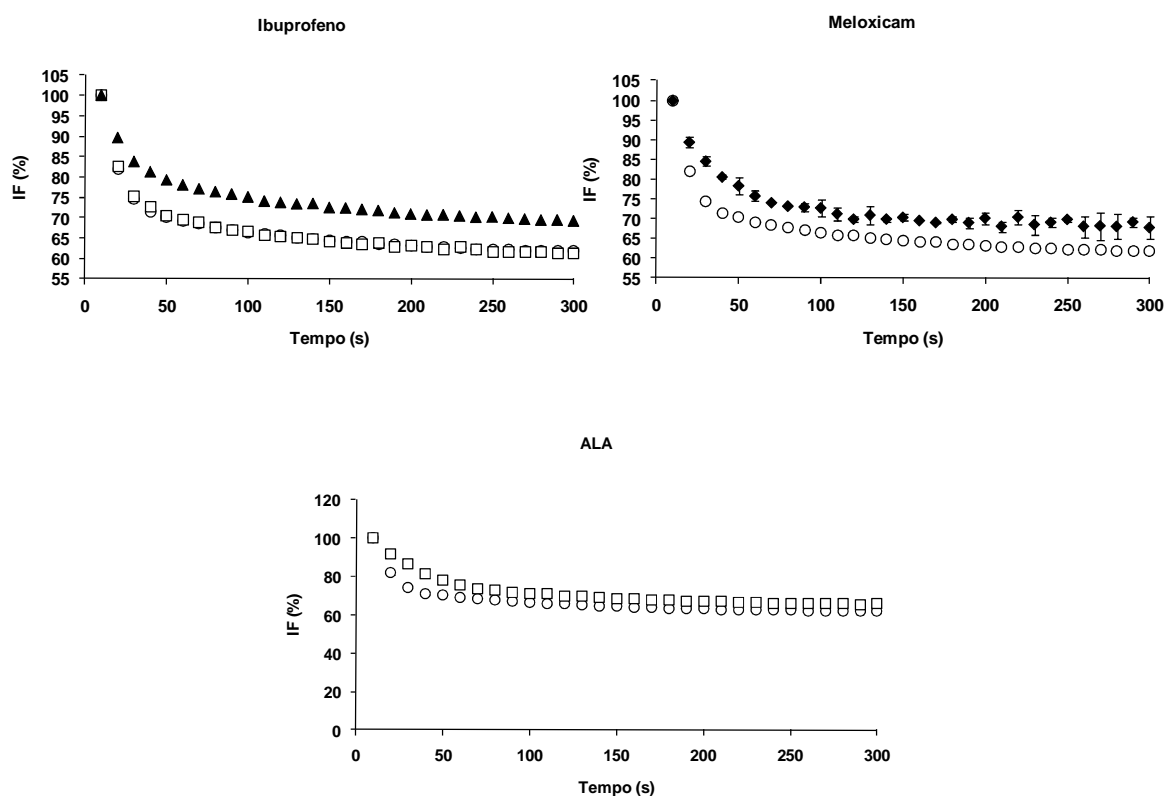
obtidos resultados satisfatórios (Figura 5.5.) quando foi efectuado um período de incubação de 10 minutos (Etapa f, Tabela 5.1.).

No caso dos AINEs testados, estes exerceram um efeito inibitório sobre a PLA<sub>2</sub> dependente da sua concentração, exceptuando o ibuprofeno, o qual apenas exibiu a acção inibitória numa concentração final de 8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 5.6.). É de ressaltar que este efeito inibitório dos AINEs sobre a PLA<sub>2</sub> apenas se verificou quando a sua incubação foi efectuada com os lipossomas, sugerindo que estes eventualmente alteram as propriedades biofísicas dos lipossomas e consequentemente limitam o acesso da PLA<sub>2</sub> ao substrato lipídico. Na verdade tem sido reportado que quer a capacidade de ligação à superfície do agregado fosfolipídico quer o “turnover” catalítico estão altamente dependentes do estado físico e do empacotamento molecular do substrato [33]. Assim, alguns inibidores interagem directamente com a enzima enquanto que outros como que alteram a “qualidade da interface” por modificação das propriedades da bicamada fosfolipídica, tornando esta inacessível à enzima [22]. Comparando a capacidade dos diferentes AINEs como inibidores da PLA<sub>2</sub>, concluiu-se que a tolmetina foi o fármaco mais potente, apresentando inclusive uma eficiência de inibição superior à do controlo positivo ALA. Na verdade, a tolmetina tem uma localização preferencial ao nível da superfície membranar (confirmada através de ensaios de desactivação de fluorescência [34]), o que pode interferir com a adsorção da enzima ao substrato lipídico com a consequente redução da hidrólise dos fosfolípidos.

### **5.3.3. Validação dos resultados obtidos pelo método desenvolvido com os fornecidos pelos ensaios realizados em modo discreto**

Os resultados obtidos com o método proposto apresentaram concordância com os atingidos pelo método discreto de comparação. Na realidade, foram observadas percentagens comparáveis de inibição de PLA<sub>2</sub> entre os dois métodos para similares períodos de inibição da hidrólise fosfolipídica e para as mesmas concentrações de inibidores (Figura 5.7.). Adicionalmente, os ensaios efectuados em modo discreto suportam que a PLA<sub>2</sub> é efectivamente inibida pelos AINEs e pelo ALA de acordo com os mecanismos anteriormente referidos. Não obstante disso, foi verificada uma variação significativa dos sinais analíticos referentes a réplicas dos ensaios em modo discreto, devido a um ineficiente controlo de tempo, contrariamente ao rigoroso controlo de tempo da metodologia de fluxo empregue. No que respeita à precisão do método desenvolvido, foi estimado um RSD de 1,6% para uma concentração de 0,625 U mL<sup>-1</sup> PLA<sub>2</sub>. Adicionalmente, o método desenvolvido é vantajoso em termos de rapidez, já que os

métodos discretos incluem um período de incubação inicial de 10 minutos e um período de leitura cinética após a adição da  $\text{PLA}_2$  ao substrato [35], para além do tempo dispendido na adição dos reagentes. No presente método, são necessários cerca de 720 segundos para completar um ciclo analítico.



**Figura 5.7.** Avaliação da eficiência de inibição exibida pelos fármacos testados pelo método discreto de comparação. Resultados obtidos da incubação dos AINEs com os lipossomas: ibuprofeno: 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (○) ; 4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (□); 8  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (▲); meloxicam: 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (○) ; 6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (◆) e da incubação do ALA com  $\text{PLA}_2$ : 0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (○) ; 4  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (□).

## **5.4. Conclusões**

A metodologia SIA proposta foi aplicada com sucesso à avaliação da actividade da PLA<sub>2</sub> bem como da eficiência de inibição dos AINEs sobre a PLA<sub>2</sub>, com resultados comparáveis aos obtidos com procedimentos discretos. Esta metodologia automática representa uma notável melhoria na precisão, eficiência e rapidez quando comparado com os ensaios realizados em modo discreto. Por outro lado, o controlo rigoroso do tempo no decorrer de todos os ensaios inerente à metodologia proposta reveste-se de extrema importância, sendo praticamente impossível de o assegurar aquando da análise de diferentes amostras com o método de comparação.

O sistema desenvolvido ilustra bem a versatilidade deste tipo de técnica ao permitir a incorporação, numa das portas da válvula selectora, de uma câmara de mistura que garantiu o estabelecimento das condições óptimas para o desenvolvimento da reacção da PLA<sub>2</sub>, cuja acção ocorre na interface lípido-água. Foi também demonstrada a possibilidade de automatização de todo o procedimento analítico com vista à avaliação do efeito dos AINEs sobre a actividade da PLA<sub>2</sub> com a incorporação de uma segunda câmara de mistura. O modo de funcionamento peculiar da válvula selectora e a facilidade de inversão do sentido do fluxo facilitaram a gestão das soluções envolvidas nas reacções ao permitir a aspiração das diferentes zonas correspondentes em diferentes momentos e a sua introdução na câmara de mistura na altura propícia. Assim, foram criadas condições favoráveis à reacção hidrolítica da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas e consequente mudança do ambiente em torno da sonda ANS, o que se mostrou determinante para a sensibilidade e viabilidade do estudo da actividade da PLA<sub>2</sub>. A introdução da câmara de mistura permitiu por outro lado a manipulação das soluções de lipossomas de natureza viscosa e subsequente incubação com a sonda ANS.

As características particulares da montagem permitiram ainda a implementação de uma estratégia de fluxo monosegmentado durante a aspiração das soluções envolvidas na avaliação da actividade da PLA<sub>2</sub> sobre os lipossomas.

Esta metodologia constitui uma alternativa válida para a avaliação do efeito dos anti-inflamatórios sobre a PLA<sub>2</sub> e como tal pode constituir uma estratégia importante para o desenvolvimento de novos e mais potentes agentes anti-inflamatórios no campo farmacêutico-biomédico. Por outro lado, esta metodologia representa uma ferramenta conveniente, útil e económica, que pode ser usada em outros estudos de inibição da PLA<sub>2</sub> ao nível da interface das membranas. Esta metodologia permite pois a realização de estudos de modulação da actividade enzimática por alteração das propriedades interfaciais e, em segundo plano, a mimetização e o paralelismo com algumas situações a nível biológico.

A aplicação de sistemas microheterogéneos em sistemas SIA abre pois interessantes oportunidades de análise sistemática da actividade enzimática, ou mesmo da monitorização em tempo real de analitos.



## **5.5. Referências bibliográficas**

- [1] Brandão F, Monteiro JG, Araújo D. Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteróides. Antigotosos. In: Osswald W, Guimarães S, editors. Terapêutica Medicamentosa e suas Bases Farmacológicas. Porto: Porto Editora; 2001. p. 179 -95.
- [2] Vane JR, Botting J, Botting RM. Improved Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs-COX-2 Enzyme Inhibitors. London: Kluwer Academic Publishers; 1996.
- [3] Monti MC, Casapullo A, Santomauro C, D'Auria MV, Riccio R, Gomez-Paloma L. The molecular mechanism of bee venom phospholipase A(2) inactivation by bolinaquinone. *ChemBioChem* 2006 Jun; 7 (6): 971-80.
- [4] Singh N, Jabeen T, Somvanshi RK, Sharma S, Dey S, Singh TP. Phospholipase A(2) as a target protein for nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Crystal structure of the complex formed between phospholipase A(2) and oxyphenbutazone at 1.6 angstrom resolution. *Biochemistry* 2004 Nov 23; 43 (46): 14577-83.
- [5] Yedgar S, Lichtenberg D, Schnitzer E. Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2000 Oct 31; 1488 (1-2): 182-7.
- [6] Reynolds LJ, Washburn WN, Deems RA, Dennis EA. Assay Strategies and Methods for Phospholipases. *Methods Enzymol* 1991; 197: 3-23.
- [7] Yu L, Dennis EA. Thio-Based Phospholipase Assay. *Methods Enzymol* 1991; 197: 65-75.
- [8] Washburn WN, Dennis EA. Novel General-Approach for the Assay and Inhibition of Hydrolytic Enzymes Utilizing Suicide-Inhibitory Bifunctionally Linked Substrates (Siblinks) - Exemplified by a Phospholipase a-2 Assay. *J Am Chem Soc* 1990 Feb 28; 112 (5): 2040-1.
- [9] Washburn WN, Dennis EA. Suicide-Inhibitory Bifunctionally Linked Substrates (Siblinks) as Phospholipase a-2 Inhibitors. *J Am Chem Soc* 1990 Feb 28; 112 (5): 2042-3.
- [10] Morales R, Fernandez MS. Interfacial activation of porcine pancreatic phospholipase A(2) studied with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-labeled lipids. *Arch Biochem Biophys* 2002 Feb 15; 398 (2): 221-8.

- [11] Bayburt T, Yu BZ, Street I, Ghomashchi F, Laliberte F, Perrier H, et al. Continuous, Vesicle-Based Fluorometric Assays of 14- and 85-Kda Phospholipases a(2). *Anal Biochem* 1995 Nov 20; 232 (1): 7-23.
- [12] Roberts MF. Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy to Follow Phospholipase Kinetics and Products. *Methods Enzymol* 1991; 197: 31-48.
- [13] Yao Y, Wang MH, Zhao KY, Wang CC. Assay for enzyme activity by following the absorbance change of pH-indicators. *J Biochem Biophys Methods* 1998 Jun 11; 36 (2-3): 119-30.
- [14] Meyuhas D, Yedgar S, Rotenberg M, Reisfeld N, Lichtenberg D. The Use of C6-Nbd-Pc for Assaying Phospholipase-a(2)-Activity - Scope and Limitations. *Biochim Biophys Acta* 1992 Mar 25; 1124 (3): 223-32.
- [15] Richieri GV, Kleinfeld AM. Continuous Measurement of Phospholipase a(2) Activity Using the Fluorescent-Probe Adifab. *Anal Biochem* 1995 Aug 10; 229 (2): 256-63.
- [16] Wilton DC. A Continuous Fluorescence Displacement Assay for the Measurement of Phospholipase-A2 and Other Lipases That Release Long-Chain Fatty-Acids. *Biochem J* 1990 Mar 1; 266 (2): 435-9.
- [17] Kinkaid A, Wilton DC. Comparison of the Catalytic Properties of Phospholipase-A2 from Pancreas and Venom Using a Continuous Fluorescence Displacement Assay. *Biochem J* 1991 Sep 15; 278: 843-8.
- [18] Jimenez M, Cabanes J, Gandia-Herrero F, Escribano J, Garcia-Carmona F, Perez-Gilabert M. A continuous spectrophotometric assay for phospholipase A(2) activity. *Anal Biochem* 2003 Aug 1; 319 (1): 131-7.
- [19] Chen SCA, Wright LC, Santangelo RT, Muller M, Moran VR, Kuchel PW, et al. Identification of extracellular phospholipase B, lysophospholipase, and acyltransferase produced by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1997 Feb; 65 (2): 405-11.
- [20] Berg OG, Gelb MH, Tsai MD, Jain MK. Interfacial enzymology: The secreted phospholipase A(2)-paradigm. *Chem Rev* 2001 Sep; 101 (9): 2613-53.
- [21] Lúcio M. Estudos de Anti-Inflamatórios Não Esteróides em Modelos Membranares [dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2006.

- [22] Jameel NM, Shekhar MA, Vishwanath BS. alpha-lipoic acid: An inhibitor of secretory phospholipase A(2) with anti-inflammatory activity. *Life Sci* 2006 Dec 14; 80 (2): 146-53.
- [23] Santos F, Teixeira L, Lucio M, Ferreira H, Gaspar D, Lima JLFC, et al. Interactions of sulindac and its metabolites with phospholipid membranes: An explanation for the peroxidation protective effect of the bioactive metabolite. *Free Radical Res* 2008; 42 (7): 639-50.
- [24] Sousa C, Nunes C, Lucio M, Ferreira H, Lima JLFC, Tavares J, et al. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the cellular membrane fluidity. *J Pharm Sci* 2008 Aug; 97 (8): 3195-206.
- [25] McClare CWF. An accurate and convenient organic phosphorus assay. *Anal Biochem* 1971; 39 (2): 527-30.
- [26] McCormack TM, van Staden JF. Use of a sequential injection technique to evaluate the effect of mixing chambers on zone penetration. *Anal Chim Acta* 1998 Jul 3; 367 (1-3): 111-21.
- [27] Pasquini C, Deoliveira WA. Monosegmented System for Continuous-Flow Analysis - Spectrophotometric Determination of Chromium(VI), Ammonia, and Phosphorus. *Anal Chem* 1985; 57 (13): 2575-9.
- [28] Ruzicka J, Hansen EH. *Flow-Injection Analysis*. New York: Wiley; 1988. p. 299-301.
- [29] Lasic DD. Liposomes. *Sci Med* 1996; 3 (3): 34-43.
- [30] New RRC. *Liposomes - a practical approach*. New York: Oxford University Press; 1990.
- [31] Coutinho A, Costa J, Faria JL, Berberan-Santos MN, Prieto MJE. Dibucaine interaction with phospholipid vesicles. A resonance energy-transfer study. *Eur J Biochem* 1990; 189: 387-93.
- [32] Moreno MJ, Prieto M. Interaction of the peptide hormone adrenocorticotropin, ACTH (1-24), with a membrane model system: a fluorescence study. *Photochem Photobiol* 1993; 57 (3): 431-7.
- [33] Dahmen-Levison U, Brezesinski G. Methyl-branched glycerophosphocholines : monolayer disorder and its effect on the rate of phospholipase catalyzed hydrolysis. *Phys Chem Chem Phys* 2000; 2: 4605-8.

[34] Lúcio M, Ferreira H, Lima JLFC, Matos C, Castro B, Reis S. Influence of some anti-inflammatory drugs in membrane fluidity studied by fluorescence anisotropy measurements. *Phys Chem Chem Phys* 2004; 6: 1493-8.

[35] Huang CK, Zhou L, Liu Y, Lai LG. A continuous fluorescence assay for phospholipase A(2) with nontagged lipid. *Anal Biochem* 2006 Apr 1; 351 (1): 11-7.

## **CAPÍTULO 6**

---

**Avaliação da cinética da oxidação do  
ácido caféico catalisada pela tirosinase  
em sistemas contendo líquido iônico**



## **6.1. Introdução**

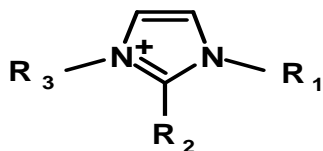
No presente trabalho, a enzima utilizada constitui o próprio analito e foram conduzidos ensaios de actividade e de inibição enzimática. O substrato seleccionado foi um derivado fenólico pouco solúvel em água, o ácido caféico. Neste sentido, o sistema aquoso contendo líquido iónico permitia a solubilização do ácido caféico e por outro lado constituía o ambiente reaccional da tirosinase. Após o estudo e optimização da actividade enzimática neste ambiente, procedeu-se à determinação dos parâmetros cinéticos da oxidação do ácido caféico pela tirosinase, designadamente os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten e de velocidade de reacção máxima, e testaram-se diferentes concentrações do líquido iónico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio. Adicionalmente, estes parâmetros cinéticos foram comparados com os obtidos num ambiente contendo um solvente orgânico convencional, e também se procedeu à avaliação do efeito de substratos análogos como inibidores.

### **6.1.1. Desenvolvimento de um sistema automático para a avaliação da cinética da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em meio de líquido iónico**

Na última década os líquidos iónicos (LIs) têm sido alvo de crescente atenção devido às suas características particulares, sendo considerados actualmente um meio reaccional muito promissor no âmbito da Química Verde. Como solventes, os LIs apresentam em relação aos solventes convencionais a vantagem de não terem pressão de vapor mensurável à temperatura ambiente. Geralmente, a emissão de vapores verifica-se a temperaturas bastante elevadas com a decomposição dos LIs, a qual por vezes não ocorre mesmo a temperaturas superiores a 400°C [1]. Como desvantagens destes solventes, são normalmente referidas a viscosidade, que dificulta a agitação e a homogeneização do meio reaccional, o elevado custo e o desconhecimento da sua toxicidade a longo prazo [2].

Os LIs contendo catiões do tipo polialquil imidazólio (Figura 6.1.) são sem dúvida os mais bem estudados e caracterizados, por possuírem diversas propriedades favoráveis, incluindo facilidade de síntese, baixa viscosidade e boa estabilidade química [3]. A natureza das cadeias laterais presentes no anel imidazólio conduz a interacções hidrofóbicas ou hidrofílicas que afectam a solubilidade do LI em solventes mais ou menos polares. Por outro lado, os prótons do anel imidazólio, em especial o que se situa na posição 2 ( $R_2=H$ ), são capazes de formar pontes de hidrogénio. O anião tem uma grande influência nas características de solubilidade, sendo os líquidos iónicos contendo os iões

$\text{PF}_6^-$  e  $\text{Tf}_2\text{N}^-$  em geral pouco miscíveis com a água, ou mesmo insolúveis. Ao contrário, aqueles contendo os iões  $\text{TFA}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$  e outros iões mais propensos a formar pontes de hidrogénio são mais hidrofílicos.



**Figura 6.1.** Estrutura química do catião polialquil imidazólio dos líquidos iónicos orgânicos.

Estes solventes têm vindo a ser utilizados em procedimentos biocatalíticos, como uma alternativa aos solventes orgânicos, uma vez que inúmeras enzimas mantêm a sua actividade neste meio reaccional podendo, em alguns casos, até aumentá-la [4]. Neste sentido, têm sido efectuados estudos de avaliação da eficiência, estabilidade e selectividade enzimáticas que atribuem aos LIs o papel de classe de solventes mediadora de reacções enzimáticas [4-9]. A capacidade adicional de permitir a solubilização de uma variedade ampla de substratos com baixa solubilidade em água apresentada pelos LIs, reforça esta classe como uma alternativa aos solventes orgânicos, e por outro lado conduz ao aparecimento de novas aplicações para procedimentos enzimáticos operados neste meio reaccional. Neste sentido, é importante conhecer o comportamento das enzimas no meio constituído por LIs para poder explorar todas as potencialidades das aplicações das enzimas neste ambiente. Têm sido reportados na literatura alguns estudos cinéticos em modo discreto para o estudo da catálise enzimática usando LIs como meio reaccional [10-14] quer avaliando a forma como os LIs influenciam a velocidade da reacção quer apurando de que forma modificam os mecanismos da própria reacção [15].

A implementação destes ensaios enzimáticos em meios constituídos por LI em sistemas de fluxo baseados na técnica SIA mostrou ser vantajosa [16], uma vez que assegura um consumo reduzido de solvente e dos diferentes reagentes envolvidos e possibilita a mecanização destes ensaios em sistemas aquosos contendo LI com uma elevada versatilidade. Adicionalmente, as metodologias de fluxo representam uma fonte constante de informação cinética, uma vez que os gradientes de concentração gerados nos diversos instantes do transporte convectivo comportam consigo informação dinâmica através dos inúmeros elementos com diferentes valores de dispersão [17].

Deste modo, o desenvolvimento de metodologias SIA para estudos cinéticos de biocatálise de substratos com baixa solubilidade em água em sistemas aquosos contendo



LIs constitui assim uma ferramenta importante para aferir as potencialidades deste novo meio reaccional.

No presente trabalho, a avaliação da actividade enzimática no meio reaccional contendo LI foi efectuada com a enzima tirosinase e um substrato com baixa solubilidade em água, o ácido caféico, através da determinação dos parâmetros cinéticos, designadamente os valores das constantes aparentes de Michaelis-Menten ( $K_M^{ap}$ ) e de velocidade de reacção máxima ( $V_{max}^{ap}$ ).

A tirosinase é uma das enzimas pertencente ao grupo das oxidoreductases de maior interesse na síntese orgânica [18], que intervém na formação de vários produtos importantes em áreas como as indústrias farmacêutica e da química fina [19]. Este grupo de enzimas catalisa efectivamente reacções selectivas de oxidação-redução de compostos orgânicos em sistemas reaccionais constituídos por LIs e a sua aplicação em processos de biotransformação é de elevada importância no campo ambiental [20]. A tirosinase catalisa a oxidação dos o-difenóis a o-quinonas na presença de oxigénio molecular [21] e encontra-se referido na literatura que esta enzima apresenta maior actividade em meio orgânico que em meio aquoso [22]. Adicionalmente, devido à baixa solubilidade em água dos derivados fenólicos, estes substratos são normalmente dissolvidos em solventes orgânicos alcoólicos [23, 24]. Por outro lado, tem sido reportado que a eficiência de extracção dos ácidos fenólicos das plantas e fruta aumenta com o aumento da proporção de metanol no solvente [25] e que os extractos metanólicos obtidos são utilizados directamente para a análise do teor fenólico total.

Na presente aplicação, utilizou-se o LI tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazólio ([bmim][BF<sub>4</sub>]) e procurou-se avaliar a adequabilidade deste LI como alternativa aos solventes orgânicos convencionais na dissolução do ácido caféico e como ambiente reaccional para a oxidação do substrato catalisada pela tirosinase. Neste sentido, foi avaliada a influência do metanol e de diferentes concentrações de [bmim][BF<sub>4</sub>] na actividade da tirosinase sobre o ácido caféico. Paralelamente, o comportamento de potenciais inibidores da tirosinase em ambiente de LIs foi igualmente averiguado.

## 6.2. Material e métodos

### 6.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue na avaliação da cinética da oxidação do ácido caféico pela tirosinase em ambiente de LI era a solução tampão universal de Britton e Welford, obtida por dissolução do ácido bórico (Sigma-Aldrich), ácido cítrico (Sigma-Aldrich), ácido 5,5'-dietilbarbitúrico (Merck) e diidrogenofosfato de potássio (Riedel-de-Haën), numa concentração de  $0,0286 \text{ mol L}^{-1}$ . O pH desta solução era ajustado a 6,5 unidades com uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Pronalab).

A solução padrão concentrada de ácido caféico (Sigma-Aldrich) era diariamente preparada dissolvendo a quantidade apropriada em misturas de LI ([bmim][BF<sub>4</sub>], Sigma)/tampão (1:1, 1,5:1 e 1:2). As soluções padrão de trabalho correspondentes eram então preparadas por diluição rigorosa desta solução padrão concentrada nas referidas misturas de LI/tampão.

Para o estudo comparativo do efeito dos solventes orgânicos na actividade da tirosinase, foram preparadas soluções padrão de trabalho de ácido caféico de forma similar, substituindo o LI por metanol (Fisher Scientific).

Para a estimação do efeito inibitório sobre a actividade difenolase da tirosinase, as soluções de ácido *trans*-cinâmico (Sigma) e de ácido 3,4-dihidroxibenzóico (Fluka) eram igualmente preparadas em misturas de LI/tampão.

A solução de tirosinase (EC 1.14.18.1, de cogumelo da espécie *Agaricus bisporus*, com actividade específica de  $5370 \text{ U mg}^{-1}$  de sólido, Sigma Aldrich) de  $54 \text{ U mL}^{-1}$  era igualmente preparada na solução tampão sendo congelada a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e descongelada a  $25^{\circ}\text{C}$  aquando do seu uso.

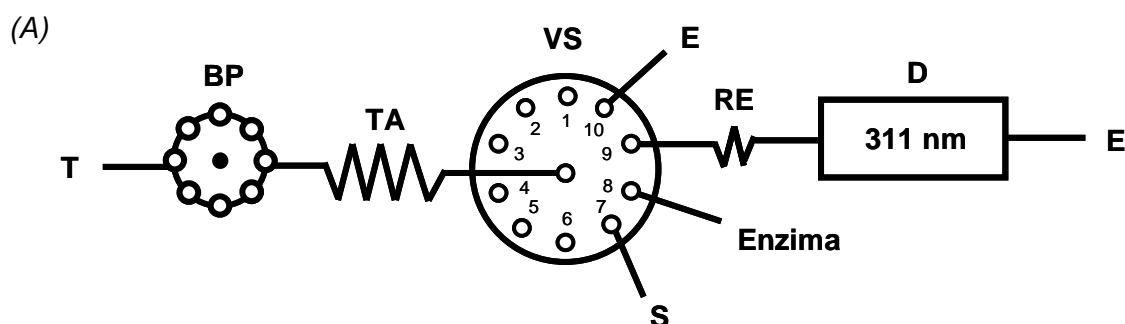
Todas estas soluções eram protegidas da luz no decorrer dos ensaios.

Uma solução de verde de bromocresol (Fluka), sal sódico, foi usada para a determinação dos factores de diluição e subsequentemente as concentrações de reagentes na célula de fluxo através da medida da absorvância a  $614 \text{ nm}$ .

### 6.2.2. Aparelhagem

O sistema de injeção sequencial apresentava na unidade propulsora um tubo de impulsão de PVC com 1,30 mm de diâmetro interno. O tubo de armazenamento e o reactor apresentavam comprimentos de 150 e 50 cm, respectivamente, ambos com configuração em figuras de oito.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 6.2.), designadamente, bomba peristáltica, válvula selectora de fluidos, banho termostatzado, espectrofotómetro e registador, foram previamente descritos no Capítulo 2.



**Figura 6.2.** (A) Esquema do módulo analítico desenvolvido para a avaliação da cinética da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em meio de LI: **T** – Solução transportadora de tampão Britton e Welford pH 6,5; **BP** – Bomba peristáltica bidireccional; **TA** – Tubo de armazenamento; **VS** – Válvula selectora de fluidos; **S** – Solução padrão de ácido caféico ou da mistura ácido caféico-inibidor; **RE** – Reactor; **D** – Detector espectrofotométrico ( $\lambda = 311 \text{ nm}$ ); **E** – Esgoto. (B) Fotografia da montagem desenvolvida.

### 6.2.3. Procedimento experimental

O ciclo analítico proposto para o estudo da cinética da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase era composto por 5 etapas (Tabela 6.1.). Assim, no início de cada ciclo 10  $\mu\text{L}$  da solução de ácido caféico (ou mistura do ácido caféico e inibidor) e 20  $\mu\text{L}$  da solução de tirosinase eram aspirados para o tubo de armazenamento (etapas a-b). Após a inversão do sentido de fluxo, a zona composta era propulsão através do tubo de reacção até ao detector (etapa c), seguido de um período de paragem de 60 segundos com aquisição do sinal analítico (etapa d). O ciclo terminava com a limpeza da célula de fluxo por propulsão da solução tampão transportadora (etapa e).

**Tabela 6.1.** Protocolo analítico para o estudo da cinética de oxidação do ácido caféico pela tirosinase e sua inibição em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico

Etapa	Posição da válvula	Tempo de operação (s)	Caudal ( $\text{mL min}^{-1}$ )	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Descrição
a	7	0,75	0,8	10	Aspiração do ácido caféico/mistura de ácido caféico e inibidor para o TA
b	8	1,50	0,8	20	Aspiração da enzima para o TA
c	9	18	2	600	Propulsão do conteúdo do TA até ao detector
d	9	60	-	-	Período de paragem com aquisição do sinal
e	9	75	3	3750	Propulsão do líquido transportador para lavar a célula de fluxo

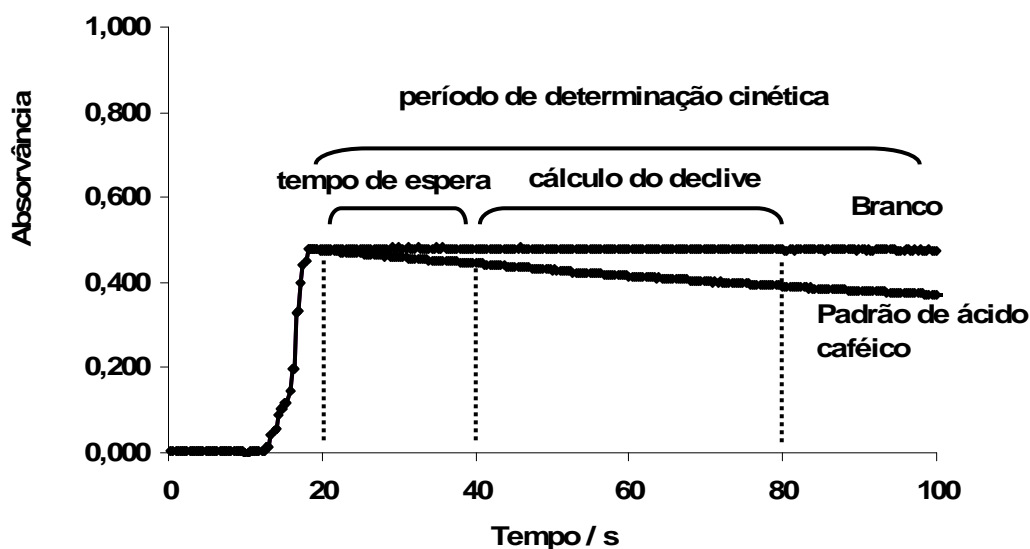
#### 6.2.3.1. Determinação das velocidades de reacção

Os segmentos de solução de ácido caféico e de enzima eram transportados até ao detector (etapa c) para a monitorização da degradação do ácido caféico no comprimento de onda correspondente à absorção máxima (311 nm). Esta monitorização (Figura 6.3.) ocorria durante o período de paragem de fluxo de 60 segundos (etapa d), com leituras de absorvância contínuas (4 leituras por segundo). Após o término do tempo de paragem, a bomba peristáltica era reactivada e por propulsão do transportador o conteúdo da célula de fluxo era enviado para o esgoto, dando início a um novo ciclo analítico. No período de paragem de fluxo, foi escolhido um intervalo fixo de aquisição de

dados (20-60 segundos), para o qual o declive da recta era calculado, avaliando-se assim a velocidade de reacção ( $-dA/dt$ ).

As velocidades de reacção (expressas em unidades de  $\Delta UA\ s^{-1}$ ) eram calculadas segundo uma cinética de ordem zero pela regressão linear simples aplicando o método dos mínimos quadrados sobre os dados obtidos durante esse período. Esta relação era considerada linear após uma inspecção visual dos gráficos, para um número de pontos superior a 50, e quando o coeficiente de correlação era superior a 0,995.

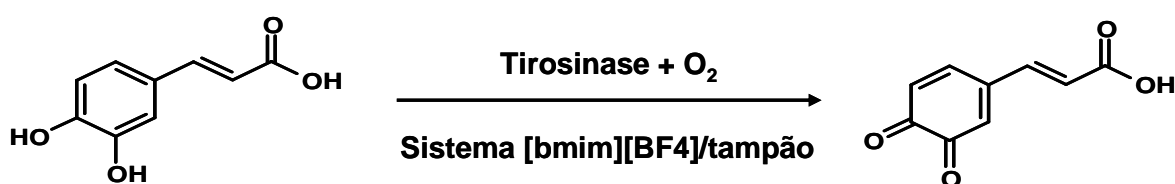
Os parâmetros cinéticos, constante aparente de Michaelis-Menten ( $K_M^{ap}$ ) e a velocidade máxima ( $V_{max}^{ap}$ ) foram obtidos através de uma regressão não linear do gráfico das velocidades iniciais ( $V_0 - \Delta UA\ s^{-1}$ ) versus a concentração de substrato ( $[S]$ ), utilizando o programa GraphPad Prism 4 para Windows. Aquando da monitorização da degradação do ácido caféico, os valores de  $V_0$  eram determinados a tempos de reacção curtos em quadruplicado para cada  $[S]$ .



**Figura 6.3.** Registo obtido da oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI durante os ensaios. Os brancos são realizados na ausência da enzima. A concentração de substrato é igual a  $0,053\ mmol\ L^{-1}$ .

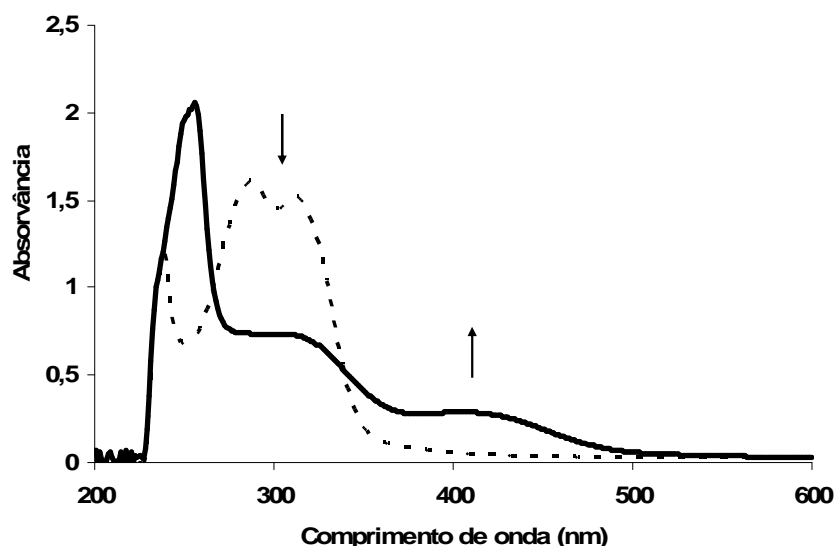
### 6.3. Resultados e sua discussão

A adequabilidade dos líquidos iónicos como meio reaccional das reacções catalisadas pela tirosinase foi avaliada na oxidação de um substrato com baixa solubilidade em água, o ácido caféico (Figura 6.4.). Recorrendo a um LI miscível com a água, [bmim][BF<sub>4</sub>], como componente não aquoso do meio reaccional, conseguia-se a solubilização do ácido caféico.



**Figura 6.4.** Oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase com formação da o-quinona correspondente.

Antes da optimização do sistema SIA, efectuou-se um ensaio discreto que consistiu na incubação do ácido caféico, dissolvido numa mistura de LI/tampão 1:1, com a tirosinase por um período de 10 minutos. Da incubação resultaram mudanças características no espectro de ultravioleta-visível (Figura 6.5.), as quais não ocorrem na ausência de enzima ou do ácido caféico. Foram observados dois pontos isobéticos nos comprimentos de onda de 267 e 339 nm, com uma diminuição acentuada da absorvância a 311 nm e um aumento ligeiro da mesma no intervalo de 400-450 nm. Este último aumento é devido à formação das o-quinonas características [26]. No entanto, a aplicabilidade de métodos baseados na determinação das o-quinonas é limitada dada a instabilidade química das o-quinonas e a interferência da absorção de intermediários ou de produtos formados [27]. Desta forma, optou-se por acompanhar o decurso desta reacção através da monitorização da degradação do substrato no comprimento de onda de absorção máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) [24]. Para a presente aplicação foi então seleccionado 311 nm para efectuar a avaliação da oxidação biocatalítica do ácido caféico no sistema SIA.



**Figura 6.5.** Espectro de ultravioleta-visível do ácido caféico ( $0,55 \text{ mmol L}^{-1}$ ) dissolvido na mistura [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão 1:1 antes (linha tracejada) e após (linha contínua) a adição da tirosinase ( $200 \text{ U mL}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram efectuados a  $25^{\circ}\text{C}$  usando uma cuvete termostatzada, com agitação magnética e com um percurso óptico de 1 cm. Os varrimentos foram efectuados no intervalo de comprimento de onda de 200-600nm. As setas ilustram o aumento ou a diminuição da absorvância.

### 6.3.1. Optimização do sistema

O intervalo estudado das diferentes variáveis bem como os valores seleccionados para a avaliação da cinética de degradação do ácido caféico pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI encontram-se sumarizados na Tabela 6.2.

Para determinar a concentração de cada reagente na célula de fluxo, foram conduzidos ensaios de dispersão com corantes [28] para determinar os factores de diluição dos reagentes, usando o protocolo definido na Tabela 6.1. Desta forma, todas as concentrações apresentadas neste trabalho referem-se às concentrações na célula de fluxo. Estes ensaios mostraram uma completa sobreposição das zonas correspondentes ao substrato ácido caféico e à enzima tirosinase na célula de fluxo, o que confirmou a mistura eficiente destes dois reagentes [29].

**Tabela 6.2.** Intervalos de valores estudados na optimização dos diferentes parâmetros do sistema e os valores escolhidos para a sua operação

Parâmetro	Intervalo	Valor seleccionado
Intervalo de tempo de propulsão da zona reaccional em direcção ao detector	15 – 22	18
Concentração da enzima (U mL <sup>-1</sup> )	11 – 217	54
pH da solução tampão transportadora	5,5 – 7,5	6,5
Temperatura (°C)	25 – 50	30
Período de tempo de aquisição do sinal (s)	0 – 120	20 – 60

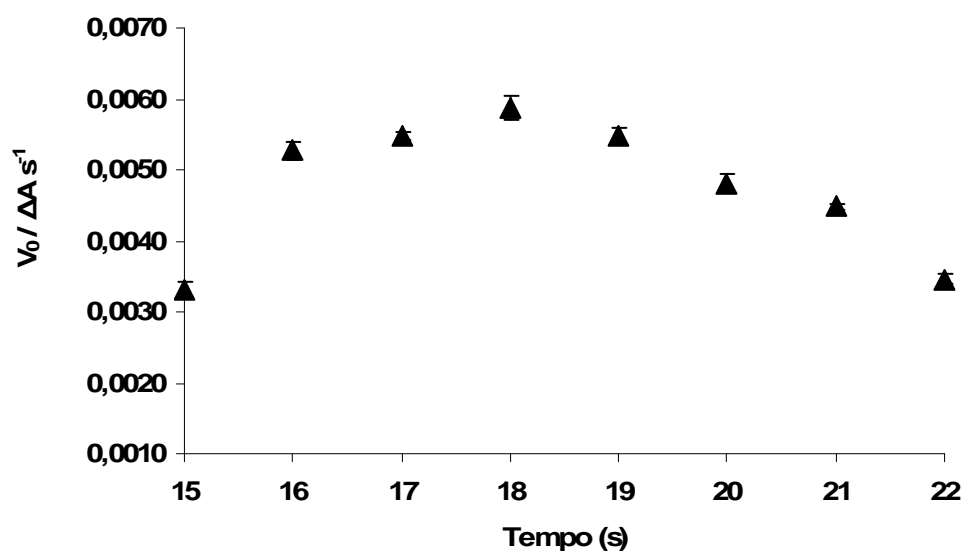
#### 6.3.1.1. Ordem de aspiração e volume de solução enviado para o detector

Em relação ao protocolo analítico, as soluções foram aspiradas para o TA na seguinte ordem: substrato, dissolvido em misturas [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão em diferentes proporções, e a enzima. A enzima deve ser o último reagente a ser aspirado para o TA de forma a minimizar a sua diluição. Por outro lado, a alíquota de ácido caféico em misturas [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão devido à sua viscosidade deve apresentar volume reduzido, de forma a permitir uma mistura efectiva das alíquotas aspiradas. Adicionalmente, foi utilizado um tubo de reacção de 50 cm, com configuração em figuras de oito, para promover a mistura eficiente das duas alíquotas e desta forma evitar a formação de uma zona de reacção não homogénea. Assim, o ciclo analítico adoptado envolvia a aspiração de 10 µL do substrato dissolvido numa mistura [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão e 20 µL de enzima, uma vez que esta sequência possibilitava a obtenção de sinais analíticos repetíveis com a forma de picos únicos.

Posteriormente, foram efectuados estudos preliminares de forma a averiguar a influência do volume de solução propulsionado para o detector (etapa c, Tabela 6.1) sobre a velocidade da reacção. Para o efeito, foram aspirados 10 µL de uma solução padrão de ácido caféico (0,311 mmol L<sup>-1</sup>) e 20 µL de solução de tirosinase (109 U mL<sup>-1</sup>) para o TA. Estas zonas eram depois enviadas para o detector durante intervalos de tempo diferentes, entre 15 e 22 segundos, com o objectivo de garantir que a zona composta ficasse aprisionada dentro da célula de fluxo. Em cada um destes ensaios, a



zona composta era mantida dentro da célula de fluxo por um período de 60 segundos e o intervalo 20-60 segundos era considerado para o cálculo do declive (Figura 6.3.). Os resultados obtidos para os tempos estudados estão ilustrados na Figura 6.6. Para os ensaios seguintes, o tempo de propulsão da zona reaccional em direcção ao detector foi fixado em 18 segundos (correspondente a um volume de 600  $\mu\text{L}$ ), já que este proporcionava o declive mais acentuado.

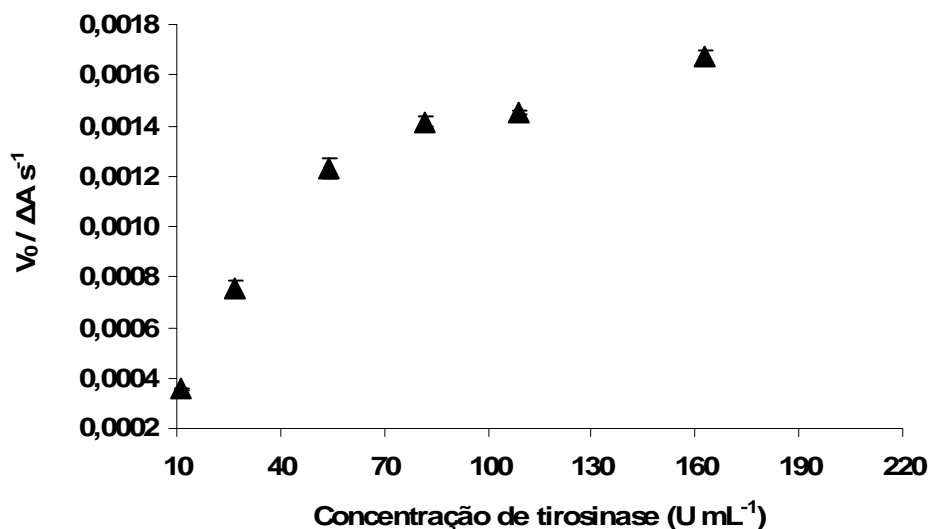


**Figura 6.6.** Velocidades de reacção ( $\Delta\text{UA s}^{-1}$ ) ( $n=3$ ;  $\text{RSD} < 3,0\%$ ) obtidas com uma solução padrão de ácido caféico  $0,311 \text{ mmol L}^{-1}$  para diferentes intervalos de tempo de propulsão da zona reaccional para o detector antes da aquisição do sinal.

#### 6.3.1.2. Concentração de enzima

A concentração de enzima foi estudada entre 11 e  $217 \text{ U mL}^{-1}$ , mantendo as condições experimentais descritas anteriormente. Os resultados obtidos para a solução padrão de ácido caféico  $0,053 \text{ mmol L}^{-1}$  estão apresentados na Figura 6.7. A velocidade de reacção aumentava proporcionalmente com o aumento da concentração de enzima até  $54 \text{ U mL}^{-1}$  e para concentrações superiores era atingida uma estabilização. Para a concentração de enzima mais elevada ( $217 \text{ U mL}^{-1}$ ), a relação absorvância/tempo não era linear durante o intervalo de tempo de monitorização do sinal analítico. Os resultados obtidos para as restantes soluções padrão de ácido caféico foram similares. Neste sentido e, tendo como pressuposto que uma cinética de ordem zero é atingida quando a concentração de enzima é limitante e que a velocidade de reacção deve ser proporcional

à concentração enzimática para a estimação da cinética de Michaelis-Menten [30], foi seleccionada a concentração de enzima igual a  $54 \text{ U mL}^{-1}$ .

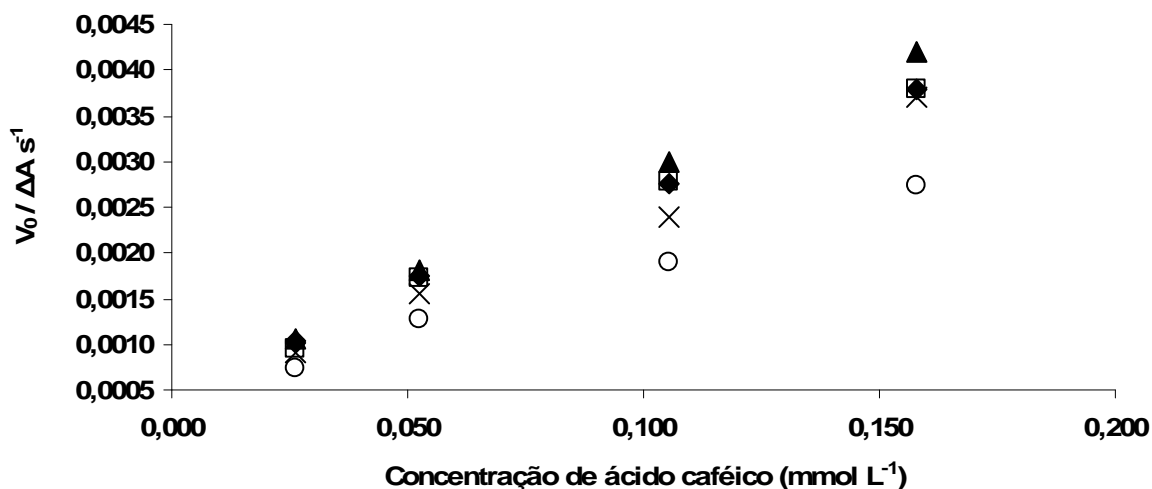


**Figura 6.7.** Velocidades de reacção ( $\Delta\text{UA s}^{-1}$ ) ( $n=3$ ;  $\text{RSD} < 3,9\%$ ) obtidas com uma solução padrão de ácido caféico  $0,053 \text{ mmol L}^{-1}$  utilizando diferentes concentrações de enzima.

### 6.3.1.3. pH e temperatura reaccional

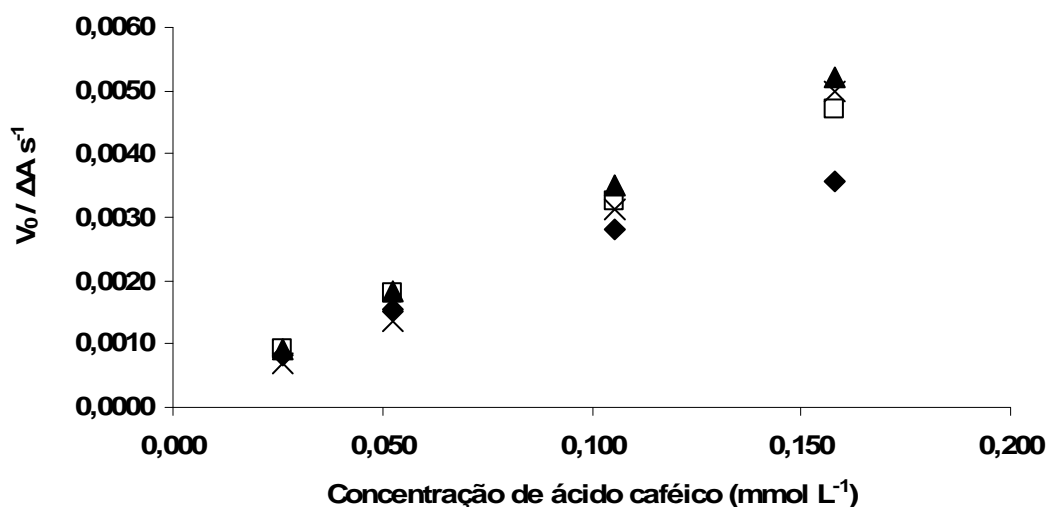
Outros factores que influenciam a actividade enzimática são o pH do meio reaccional e a temperatura.

Relativamente ao primeiro, foram efectuados estudos no intervalo 5,5 – 7,5 (Figura 6.8.), uma vez que o pH óptimo da tirosinase é entre 6 e 7 (Sigma, Informação do Produto). Foram adoptadas como condições experimentais: concentrações de ácido caféico entre  $0,026$  e  $0,158 \text{ mmol L}^{-1}$ , concentração de enzima  $54 \text{ U mL}^{-1}$  e uma temperatura igual a  $25^\circ\text{C}$ . Verificou-se um aumento da velocidade de reacção até um pH igual a 6,5 unidades e o seu decréscimo para valores de pH superiores. Deste modo, uma solução tampão com pH igual a 6,5 unidades foi usada para os ensaios seguintes.



**Figura 6.8.** Velocidades de reacção ( $\Delta A \text{ s}^{-1}$ ) obtidas no intervalo de concentrações de ácido caféico 0,026 – 0,158 mmol L<sup>-1</sup> a pH igual a 5,5 (□); 6,0 (◆); 6,5 (▲); 7,0 (x) e 7,5 (○) unidades.

Relativamente ao segundo factor, variou-se a temperatura do suporte da célula de fluxo entre 25 e 50°C (Figura 6.9.) e mantiveram-se as condições experimentais anteriores. Neste caso, foram tomados em atenção dois aspectos: 1) a existência de uma relação linear entre a absorvância e o tempo durante o período de aquisição do sinal analítico e 2) a influência da temperatura na velocidade de reacção. Para temperaturas superiores a 30°C, não havia linearidade entre a absorvância e o tempo para o intervalo de aquisição de sinal usado nos ensaios de optimização anteriores (20-60s) e como tal, para este estudo, foi considerado o intervalo de tempo de aquisição 20-40s. Verificou-se que um aumento da temperatura até 30°C conduzia a um aumento acentuado da velocidade de reacção enzimática. O aumento das velocidades de reacção obtido a uma temperatura igual a 40°C para as soluções padrão de ácido caféico de concentrações 0,105 e 0,158 mmol L<sup>-1</sup>, comparativamente ao de 30°C, não justificava o seu uso. Acima dos 40°C, reportou-se um decréscimo da actividade enzimática, provavelmente devido a algum grau de desnaturação da enzima. Desta forma, seleccionou-se a temperatura de 30°C para prosseguir os ensaios.



**Figura 6.9.** Velocidades de reacção ( $\Delta\text{UA s}^{-1}$ ) obtidas no intervalo de concentrações de ácido caféico 0,026 – 0,158  $\text{mmol L}^{-1}$  à temperatura de 25 (◆); 30 (□); 40 (▲); 50 °C (x).

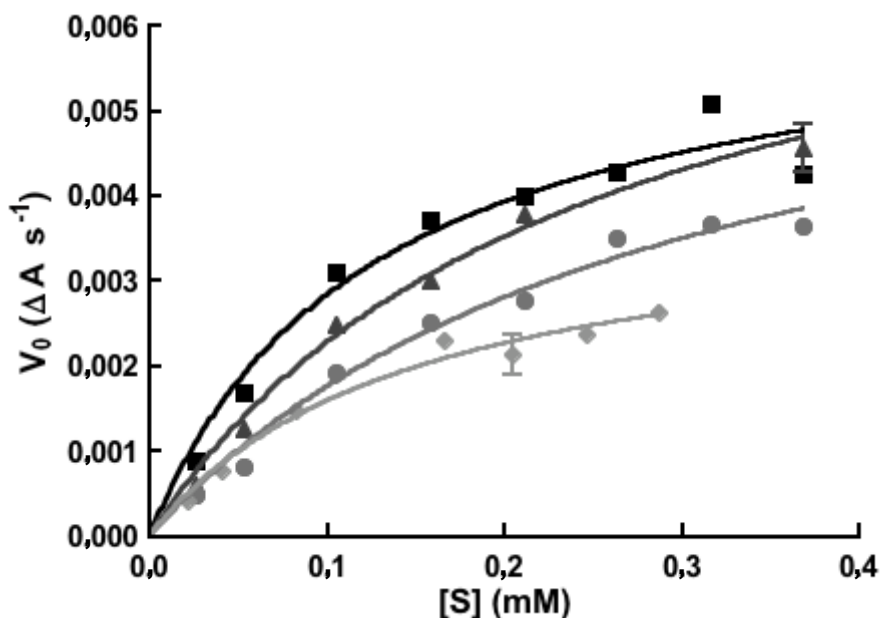
### 6.3.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico

Nas condições otimizadas, foram determinadas as constantes cinéticas da oxidação biocatalítica do ácido caféico. Para estudar a influência da concentração do LI usado no comportamento cinético da tirosinase, a reacção ocorreu na presença de concentrações crescentes de [bmim][BF<sub>4</sub>] (Tabela 6.3.).

**Tabela 6.3.** Constantes cinéticas obtidas na oxidação biocatalítica do ácido caféico pela tirosinase em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico

Meio de reacção	LI:tampão (1:1)	LI:tampão (1,5:1)	LI:tampão (2:1)	Metanol:tampão (1:1)
$K_M^{ap}$ ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	$0,13 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,02$
$V_{max}^{ap}$ ( $\Delta\text{A s}^{-1}$ )	$0,0064 \pm 0,0004$	$0,0077 \pm 0,0006$	$0,0069 \pm 0,0005$	$0,0040 \pm 0,0003$
$V_{max}^{ap} / K_M^{ap}$	0,05	0,03	0,02	0,03

A relação entre a velocidade de reacção e a concentração de ácido caféico ( $[S]$ ) foi determinada variando a concentração de substrato entre 0,026 e 0,368 mmol L<sup>-1</sup>, com uma concentração de tirosinase igual a 54 U mL<sup>-1</sup>. Os gráficos correspondentes são exibidos na Figura 6.10.



**Figura 6.10.** Gráficos de Michaelis-Menten em sistemas aquosos contendo LI/solvente orgânico: LI:tampão 1:1 (■); LI:tampão 1,5:1 (▲); LI:tampão 2:1 (●) e metanol:tampão 1:1 (◆).

Os valores de  $K_M^{ap}$  representam a afinidade do substrato para a enzima e como tal quanto menor for o  $K_M^{ap}$ , maior será a afinidade. Assim, constatou-se que o ácido caféico exibiu uma maior afinidade para a tirosinase no meio reaccional composto pela mistura [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão 1:1 quando comparado com os que apresentavam uma concentração superior de LI, de acordo com os valores de  $K_M^{ap}$  de 0,13, 0,24 e 0,29 mmol L<sup>-1</sup> para as misturas [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão 1:1, 1,5:1 e 2:1, respectivamente (Tabela 6.3.). Por outro lado, a eficiência catalítica, dada pela razão entre o  $V_{max}^{ap} / K_M^{ap}$ , foi também estimada, constituindo um indicador da capacidade da enzima para converter o substrato nos produtos finais correspondentes. Uma vez mais, a eficiência catalítica da tirosinase no meio reaccional constituído pela mistura [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão 1:1 foi superior à obtida nos meios com maior teor de LI. É importante salientar que a  $V_{max}^{ap}$  manteve-se aproximadamente constante (Tabela 6.3.).

Estes resultados evidenciam que a tirosinase é activa neste LI e que concentrações crescentes de [bmim][BF<sub>4</sub>] conduzem a uma redução da sua actividade.

Diversas propriedades dos LIs, tais como, polaridade, basicidade da ligação de hidrogénio, nucleofilicidade do anião influem em grande extensão na actividade e estabilidade das enzimas [31]. Neste caso, designadamente para a tirosinase, a polaridade da ligação B-F no anião  $\text{BF}_4^-$  pode em parte contribuir para o decréscimo da sua actividade, já que sendo a tirosinase uma enzima que contém cobre [32], existe a possibilidade de ligação entre o ião flúor e o cobre no local activo enzima [14]. Adicionalmente, de acordo com a literatura, uma grande porção da energia de ligação ao substrato envolve interacções com os grupos polares da cadeia lateral, longe do local de reacção no núcleo fenólico ou difenólico, sendo estas interacções polares particularmente responsáveis pela catálise enzimática [33]. Neste sentido, o LI usado, sendo miscível com água, pode interferir com estas interacções polares. Por outro lado, dada a elevada hidrofiliabilidade do líquido iónico, é provável que este penetre o microambiente aquoso que rodeia as moléculas de enzima, podendo estabelecer interacções directas com a enzima e conduzindo à sua inactivação. Este pressuposto vai ao encontro do reconhecimento da existência de uma camada de água, designada de camada de hidratação, essencial à actividade enzimática [34].

Assim, os resultados obtidos demonstraram uma eficiência máxima de catálise enzimática no sistema  $[\text{bmim}][\text{BF}_4]/\text{tampão}$  1:1, seguidos dos sistemas  $[\text{bmim}][\text{BF}_4]/\text{tampão}$  1,5:1 e  $[\text{bmim}][\text{BF}_4]/\text{tampão}$  2:1. De facto, tem sido reportado na literatura o decréscimo da actividade da tirosinase e de outras enzimas com o aumento do teor de LI [14, 35, 36].

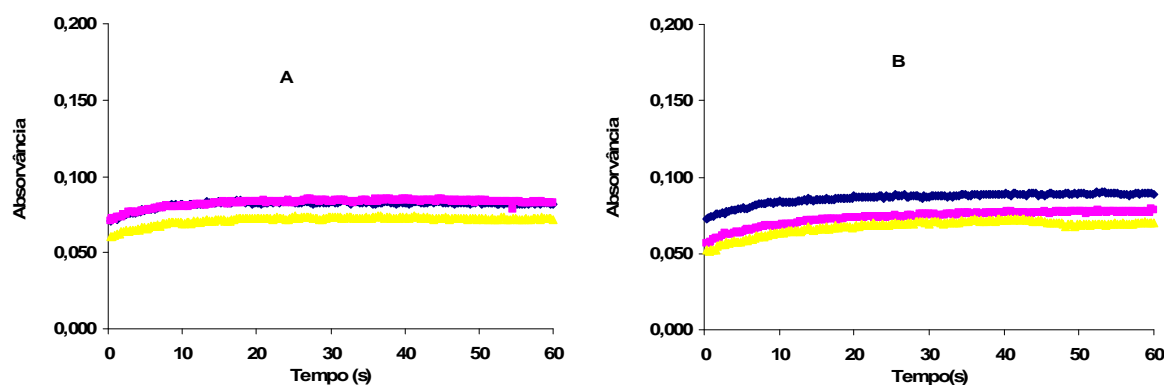
Com o objectivo de se efectuar um estudo comparativo da actividade catalítica da tirosinase nos sistemas aquosos contendo LI, foi avaliado o seu comportamento cinético em meio de metanol, utilizando o mesmo módulo analítico e as mesmas condições reaccionais quando o LI era empregue. Os resultados obtidos denotaram uma diminuição da eficiência catalítica com uma redução efectiva da  $V_{\text{max}}^{\text{ap}}$  quando comparado com o meio reaccional constituído pela mistura  $[\text{bmim}][\text{BF}_4]/\text{tampão}$  1:1 (Tabela 6.3.). Sabe-se que a estrutura da enzima e a actividade catalítica depende do papel directo e indirecto exercido pelas moléculas de água sobre todas as interacções, incluindo pontes de hidrogénio, ligações iónicas, hidrofóbicas e forças de van der Waals [37]. Neste sentido, o solvente orgânico utilizado pode modificar a estrutura proteica nativa e destruir a actividade enzimática numa extensão maior que o LI usado. Deste modo, estes ensaios reforçaram a utilização dos LIs como meio reaccional para o estudo da biocatálise da tirosinase em substituição dos solventes orgânicos convencionais.

### 6.3.3. Avaliação do efeito dos inibidores sobre a actividade difenolase da tirosinase em sistemas aquosos contendo LI

Os estudos de inibição podem fornecer informações mecanísticas dos processos bioquímicos catalisados por enzimas.

O ácido *trans*-cinâmico e os derivados do ácido benzóico têm sido reportados como inibidores da tirosinase usando L-3,4-dihidroxifenilalanina como substrato, em meio tamponado de fosfatos [38, 39]. Neste sentido, pretendeu-se avaliar a eficácia de inibição destes compostos usando o ácido caféico como substrato nos sistemas aquosos contendo o LI utilizado. Deste modo, considerando o ácido *trans*-cinâmico e o ácido 3,4-dihidroxibenzóico como efectores, foi avaliado o impacto destes compostos sobre a actividade da tirosinase na oxidação do ácido caféico.

Os inibidores dissolvidos na mistura [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão 1:1 foram previamente ensaiados na ausência do ácido caféico para aferir a possibilidade de interferência no comprimento de onda da determinação (311 nm). Os resultados obtidos mostraram que os compostos não interferiam na determinação do ácido caféico, pois apresentavam um valor de absorvância baixo que permanecia constante ao longo do período de paragem no detector (Figura 6.11.).



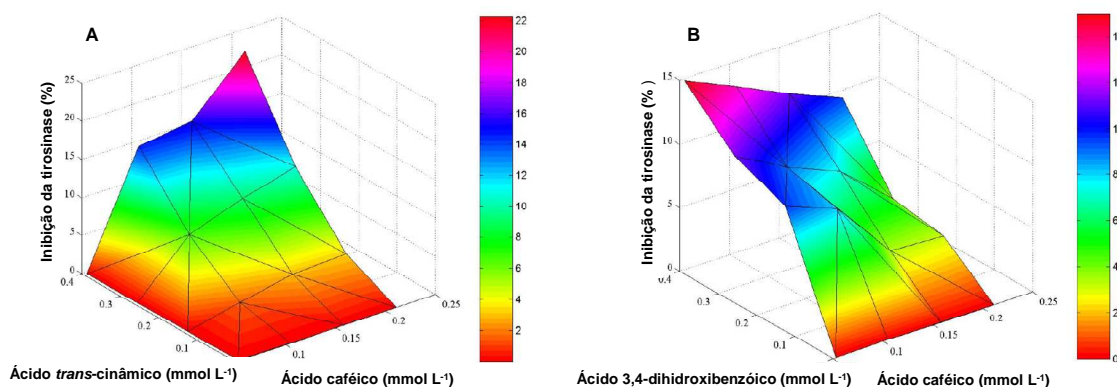
**Figura 6.11.** Monitorização da absorvância ao longo do tempo da reacção da tirosinase com os inibidores (0,263 mmol L<sup>-1</sup>) testados (A – ácido *trans*-cinâmico; B - ácido 3,4-dihidroxibenzóico) na ausência do ácido caféico. Os ensaios foram realizados em triplicado.

Seguidamente, diferentes concentrações de inibidores eram misturadas com diferentes concentrações de substrato. As soluções resultantes eram aspiradas através da válvula selectora de fluidos (etapa a, Tabela 6.1.) e o ciclo analítico prosseguia conforme descrito anteriormente.

As actividades medidas com as misturas de ácido caféico e inibidores eram consideradas como uma percentagem relativa da actividade de tirosinase obtida na ausência dos inibidores, correspondente a 0 % de inibição. Assim, a eficiência de inibição da tirosinase era expressa como a percentagem de inibição da acção da tirosinase sobre o ácido caféico. Os resultados obtidos para os compostos testados estão representados na Figura 6.12.

Ambos os inibidores exibiram uma maior eficiência de inibição com o aumento da sua concentração (até 0,395 mmol L<sup>-1</sup>) para cada concentração de ácido caféico testada. Porém, o comportamento dos compostos foi diferente. No que respeita ao ácido *trans*-cinâmico, os resultados demonstraram um aumento concomitante da eficiência de inibição com o aumento da concentração de ácido caféico. Na realidade, estes resultados apontam para uma inibição acompetitiva, que ocorre quando a concentração de substrato é elevada [30]. Neste caso, o ácido *trans*-cinâmico apenas exerceu efeito inibitório sobre a tirosinase para concentrações de ácido de caféico iguais ou superiores a 0,105 mmol L<sup>-1</sup>. Com o aumento da concentração do ácido *trans*-cinâmico, os valores de  $K_M^{ap}$  e  $V_{max}^{ap}$  diminuíam, mas a razão entre o  $K_M^{ap} / V_{max}^{ap}$  era constante e a constante de inibição ( $K_i$ ) obtida foi igual a 0,230 mmol L<sup>-1</sup>.

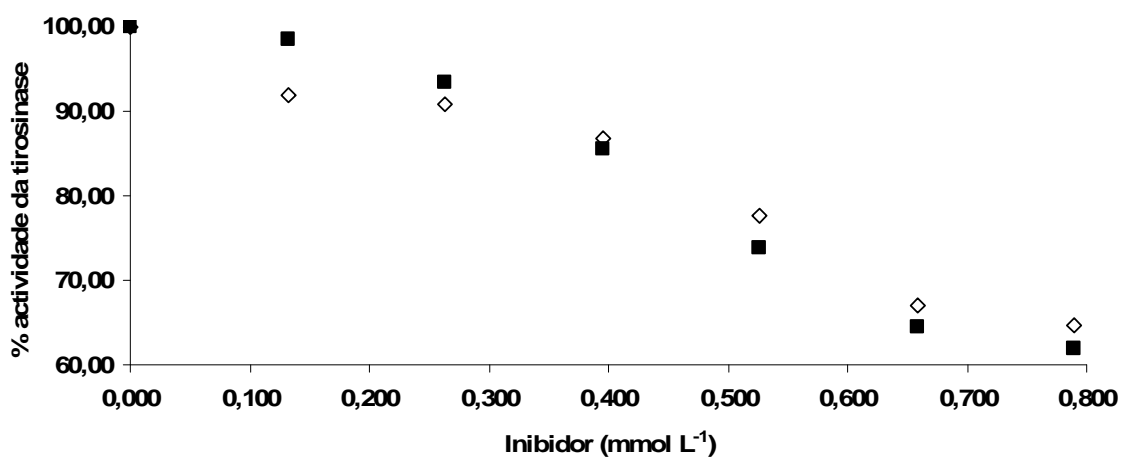
No caso do ácido 3,4-dihidroxibenzóico, foi observada uma reposta distinta com o aumento da concentração do ácido caféico. A eficiência de inibição do ácido 3,4-dihidroxibenzóico diminuía com o aumento da concentração de ácido caféico.



**Figura 6.12.** Avaliação da eficiência de inibição da tirosinase (%) apresentada pelo ácido *trans*-cinâmico (A) e pelo ácido 3,4-dihidroxibenzóico (B).



Adicionalmente, o efeito dos inibidores foi estudado para uma concentração fixa de ácido caféico ( $0,105 \text{ mmol L}^{-1}$ ). À medida que se aumentava a concentração de inibidor (até  $0,789 \text{ mmol L}^{-1}$ ), a actividade enzimática decaía gradualmente (Figura 6.13.). O  $\text{IC}_{25}$ , que corresponde à concentração de inibidor que produz uma eficiência de inibição de 25%, foi de  $0,514$  e  $0,560 \text{ mmol L}^{-1}$  para o ácido *trans*-cinâmico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico, respectivamente, ilustrando uma maior capacidade de inibição para o derivado do ácido cinâmico.



**Figura 6.13.** Influência da concentração dos inibidores na actividade da tirosinase: (■) ácido *trans*-cinâmico; (◇) ácido 3,4-dihidroxibenzóico.

#### 6.4. Conclusões

Os resultados obtidos substanciam a utilidade e a fiabilidade do procedimento automático desenvolvido como uma alternativa robusta aos procedimentos discretos habitualmente utilizados, para efectuar estudos cinéticos de reacções enzimáticas envolvendo substratos com pouca solubilidade em água e avaliar o efeito de potenciais inibidores em meios reaccionais constituídos por misturas de LI/tampão.

A abordagem apresentada exhibe vantagens em termos de aplicabilidade em rotina e segurança humana e ambiental já que exigem uma intervenção limitada do operador e envolvem um consumo reduzido de LI e dos restantes reagentes e a produção de pequenas quantidades de efluente. Os volumes reduzidos e o controlo exímio da dispersão com a metodologia SIA permitiram eliminar a interferência da viscosidade do LI no grau de mistura das soluções aspiradas bem como na detecção espectrofotométrica. Adicionalmente, o controlo estrito das condições reaccionais com uma elevada reprodutibilidade e precisão, em oposição às metodologias discretas, permite que as condições do ensaio sejam iguais ao longo das análises, o que se reveste de extrema importância em ensaios cinéticos.

O procedimento desenvolvido foi aplicado na determinação de parâmetros cinéticos da reacção de oxidação do ácido caféico catalisada pela tirosinase em misturas de [bmim][BF<sub>4</sub>]/tampão. Os resultados obtidos demonstraram uma eficiência catalítica superior no meio de LI comparativamente ao meio metanólico, que confirmou o LI em estudo como uma alternativa vantajosa ao uso do metanol. Por outro lado, verificou-se um decréscimo da actividade da tirosinase com o aumento da concentração de [bmim][BF<sub>4</sub>], decorrente de eventuais alterações na conformação da enzima ou modificações no ambiente catalítico induzidas pelo LI. Adicionalmente, os análogos testados do substrato ácido caféico, ácido *trans*-cinâmico e ácido 3,4-dihidroxibenzóico, demonstraram ser inibidores efectivos da tirosinase no meio aquoso contendo LI.

Os resultados obtidos confirmam os líquidos iónicos como meio reaccional alternativo aos solventes orgânicos, geralmente tóxicos e inflamáveis, para estudos de biocatálise envolvendo oxidoredutases, ao permitirem uma maior actividade enzimática e por outro lado reforçam a sua capacidade de dissolver uma variedade ampla de compostos com baixa solubilidade em água.

A metodologia proposta constitui assim uma ferramenta importante para a automatização de procedimentos enzimáticos em LIs, sendo menos nociva para o meio ambiente e mais eficiente que as metodologias discretas, as quais dispõem de um menor grau de automatização e consequentemente com maior probabilidade de introdução de erros com a intervenção do operador.

## **6.5. Referências bibliográficas**

- [1] Bonhote P, Dias AP, Papageorgiou N, Kalyanasundaram K, Gratzel M. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg Chem* 1996; 35 (5): 1168-78.
- [2] Jastorff B, Stormann R, Ranke J, Molter K, Stock F, Oberheitmann B, et al. How hazardous are ionic liquids? Structure-activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem* 2003; 5 (2): 136-42.
- [3] Wilkes JS. A short history of ionic liquids - from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem* 2002 Apr; 4 (2): 73-80.
- [4] van Rantwijk F, Sheldon RA. Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev* 2007 Jun; 107 (6): 2757-85.
- [5] Persson M, Bornscheuer UT. Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 2003 Apr 1; 22 (1-2): 21-7.
- [6] Park S, Kazlauskas RJ. Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology. *Curr Opin Biotechnol* 2003 Aug; 14 (4): 432-7.
- [7] Yang Z, Pan WB. Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb Technol* 2005 Jun 1; 37 (1): 19-28.
- [8] Shipovskov S, Gunaratne HQN, Seddon KR, Stephens G. Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem* 2008; 10 (7): 806-10.
- [9] Zhao H, Baker GA, Song ZY, Olubajo O, Crittle T, Peters D. Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem* 2008; 10 (6): 696-705.
- [10] Shi XA, Zong MH, Lou WY. Effect of ionic liquids on catalytic characteristics of horse liver alcohol dehydrogenase. *Chin J Chem* 2006 Nov; 24 (11): 1643-7.
- [11] Guo Z, Xu XB. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. *Green Chem* 2006 Jan; 8 (1): 54-62.
- [12] Lopez-Pastor M, Dominguez-Vidal A, Ayora-Canada MJ, Lendl B, Valcarcel M. Enzyme kinetics assay in ionic liquid-based reaction media by means of Raman spectroscopy and multivariate curve resolution. *Microchem J* 2007 Dec; 87 (2): 93-8.

- [13] Hong ES, Park JH, Yoo IK, Ryu KG. Effects of Structural Difference of Ionic Liquids on the Catalysis of Horseradish Peroxidase. *J Microbiol Biotechnol* 2009 Jul; 19 (7): 713-7.
- [14] Yang Z, Yue YJ, Huang WC, Zhuang XM, Chen ZT, Xing M. Importance of the Ionic Nature of Ionic Liquids in Affecting Enzyme Performance. *J Biochem (Tokyo)* 2009 Mar; 145 (3): 355-64.
- [15] Chiappe C, Pieraccini D, Pomelli CS. The Interactions Affecting Organic Reactivity and Selectivity in Ionic Liquids. In: Malhotra SV, editor. *Ionic Liquids in Organic Synthesis*. Washington: Amer Chemical Soc; 2007. p. 1-15.
- [16] Pinto PCAG, Saraiva MLMFS, Lima JLFC. Sequential injection analysis as a tool for implementation of enzymatic assays in ionic liquids. *Talanta* 2008 Dec 15; 77 (2): 479-83.
- [17] Hansen EH. Flow-Injection Enzymatic Assays. *Anal Chim Acta* 1989 Jan 16; 216 (1-2): 257-73.
- [18] Klibanov AM. Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14 (4): 427-31.
- [19] Muller GH, Lang A, Seithel DR, Waldmann H. An enzyme-initiated hydroxylation - Oxidation carbo Diels-Alder domino reaction. *Chem-Eur J* 1998; 4 (12): 2513-22.
- [20] Pinto P, Saraiva M, Lima J. Oxidoreductase Behavior in Ionic Liquids: a Review. *Anal Sci* 2008; 24 (10): 1231-8.
- [21] Fenoll LG, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Sevilla F, Tudela J, Garcia-Ruiz PA, Varon R, et al. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. *Eur J Biochem* 2000 Oct; 267 (19): 5865-78.
- [22] Kermasha S, Tse M. Biocatalysis of tyrosinase in chloroform medium, using selected phenolic substrates. *J Chem Technol Biotechnol* 2000 Jun; 75 (6): 475-83.
- [23] RichardForget FC, Gaillard FA. Oxidation of chlorogenic acid, catechins, and 4-methylcatechol in model solutions by combinations of pear (*Pyrus communis* Cv Williams) polyphenol oxidase and peroxidase: A possible involvement of peroxidase in enzymatic browning. *J Agric Food Chem* 1997 Jul; 45 (7): 2472-6.

- [24] Haghbeen K, Tan EW. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Anal Biochem* 2003 Jan 1; 312 (1): 23-32.
- [25] Ehala S, Vaher M, Kaljurand M. Characterization of phenolic profiles of Northern European berries by capillary electrophoresis and determination of their antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2005 Aug 10; 53 (16): 6484-90.
- [26] Lerch KK. Copper Proteins. In: Sigel H, editor. *Copper Monooxygenases: Tyrosinase, Dopamine b-Monooxygenase*. New York: Marcel Dekker; 1981.
- [27] Naishbyfield S, Riley PA. Oxidation of Monohydric Phenol Substrates by Tyrosinase - an Oximetric Study. *Biochem J* 1992 Nov 15; 288: 63-7.
- [28] Ruzicka J, Hansen EH. *Flow-Injection Analysis*. New York: Wiley; 1988. p. 299-301.
- [29] Gubeli T, Christian GD, Ruzicka J. Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry. *Anal Chem* 1991 Nov 1; 63 (21): 2407-13.
- [30] Bisswanger H. *Practical Enzymology*. Germany: Wiley-VCH; 2004. p. 10-6.
- [31] Zhao H, Olubajo O, Song ZY, Sims AL, Person TE, Lawal RA, et al. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorg Chem* 2006 Feb; 34 (1): 15-25.
- [32] Robb DA. Tyrosinase. In: Lontie R, editor. *Copper proteins and copper enzymes*. Florida: CRC Press; 1984. p. 207-41.
- [33] Granata A, Monzani E, Bubacco L, Casella L. Mechanistic insight into the activity of tyrosinase from variable-temperature studies in an aqueous/organic solvent. *Chem-Eur J* 2006 Mar 8; 12 (9): 2504-14.
- [34] Klibanov AM. Enzymes That Work in Organic-Solvents. *Chemtech* 1986 Jun; 16 (6): 354-9.
- [35] Hinckley G, Mozhaev VV, Budde C, Khmelnitsky YL. Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnol Lett* 2002 Dec; 24 (24): 2083-7.
- [36] Sgalla S, Fabrizi G, Cacchi S, Macone A, Bonamore A, Boffi A. Horseradish peroxidase in ionic liquids - Reactions with water insoluble phenolic substrates. *J Mol Catal B: Enzym* 2007 Mar 1; 44 (3-4): 144-8.

[37] Dordick JS. Enzymatic Catalysis in Monophasic Organic-Solvents. *Enzyme Microb Technol* 1989 Apr; 11 (4): 194-211.

[38] Shi Y, Chen QX, Wang Q, Song KK, Qiu L. Inhibitory effects of cinnamic acid and its derivatives on the diphenolase activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Food Chem* 2005 Oct; 92 (4): 707-12.

[39] Xie JJ, Song KK, Qiu L, He Q, Huang H, Chen QX. Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase. *Food Chem* 2007; 103 (4): 1075-9.

## **CAPÍTULO 7**

---

**Avaliação do efeito de diferentes  
derivados fenólicos no sistema de QL  
luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-peroxidase**





## **7.1. Introdução**

O presente trabalho envolve a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de quimiluminescência (QL) composto por luminol e peróxido de hidrogénio utilizando a enzima peroxidase em solução como biocatalisador da reacção. Para o efeito foi desenvolvida uma montagem com base nas técnicas SIA-MSFIA, para implementar a reacção em linha do derivado fenólico com o peróxido de hidrogénio e a peroxidase, seguida da mistura por confluência de zonas com o reagente quimiluminogénico. Após optimização e avaliação do efeito indutor/inibidor sobre o sistema de QL descrito de cada subgrupo fenólico estudado, procedeu-se à determinação dos teores de polifenóis e de fenol em vinhos e águas, respectivamente.

### **7.1.1. Desenvolvimento de uma metodologia automática para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de quimiluminescência composto por luminol, peróxido de hidrogénio e peroxidase**

O sistema de quimiluminescência (QL) luminol-peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-peroxidase (POD) tem despertado um interesse continuo em métodos analíticos com vista à descoberta de compostos que possam actuar como indutores ou inibidores deste sistema [1]. Os compostos fenólicos têm sido largamente explorados como substratos deste sistema de QL em metodologias discretas e tem sido associado o efeito de indução/inibição de vários derivados fenólicos a diferenças estruturais existentes [2]. Por outro lado, o mesmo composto pode apresentar um efeito de indução ou de inibição dependendo das condições reaccionais, como é o caso do asulam [3, 4].

Apesar de se obter uma maior selectividade e sensibilidade nas metodologias baseadas em QL, a sua implementação em modo discreto carece de repetibilidade e reprodutibilidade devido à necessidade de se realizar uma rápida mistura com uma detecção imediata. Neste sentido, o estudo do efeito de compostos sobre o sistema descrito poderá beneficiar com o controlo estrito e preciso na manipulação fluídica e da facilidade de promover diferentes condições reaccionais no mesmo módulo analítico, com a sua implementação em metodologias automáticas de fluxo.

O efeito dos compostos fenólicos sobre o sistema luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD nunca foi averiguado recorrendo a metodologias automáticas de fluxo. Os derivados polifenólicos encontram-se em abundância em várias plantas, frutas e outros alimentos e apresentam propriedades antioxidantes, podendo intervir na prevenção de doenças derivadas do stress oxidativo [5]. Por outro lado, estes compostos constituem um importante grupo de

poluentes, podendo ser encontrados nas águas residuais de diferentes ramos da indústria química e petroquímica e da indústria farmacêutica [6].

Encontram-se descritas na literatura metodologias FIA, baseadas no sistema de QL luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -POD, mas para a determinação da capacidade antioxidante de azeites [7], de pesticidas como o asulam [3, 4] e o primicarb [8].

Assim, para a implementação da avaliação do efeito dos compostos fenólicos sobre o sistema QL descrito em metodologias de fluxo, foi desenvolvido um sistema hifenizado SIA-MSFIA (análise por injeção em fluxo baseada em multisseringa, do inglês “Multisyringe flow injection analysis”). As características da técnica MSFIA, nomeadamente a operação multi-canal da multisseringa com um intervalo amplo de caudais, permitem preencher os requisitos das reacções quimiluminimétricas, ao permitir a detecção imediata do sinal analítico após adição do reagente de QL. A combinação da técnica MSFIA com a detecção quimiluminimétrica [9, 10], caracterizada por elevada sensibilidade e selectividade, amplos intervalos de zona linear, simplicidade e com instrumentação de baixo custo, apresenta um potencial analítico elevado num leque alargado de aplicações [11].

A montagem desenvolvida permitia a implementação da reacção em linha do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , do derivado fenólico e da POD, por intermédio da válvula selectora de fluidos, e a subsequente reacção quimiluminimétrica com o luminol, graças à multisseringa.

O procedimento automático proposto, baseado na acção indutora ou inibidora sobre o sistema de QL, foi aplicado para além do fenol aos subgrupos dos clorofenóis, nitrofenóis, metilfenóis e polifenóis. O método desenvolvido foi depois aplicado à determinação da capacidade antioxidante em vinhos e do teor de fenol em águas de origens diferentes.

## 7.2. Material e métodos

### 7.2.1. Reagentes e soluções

A solução de transporte empregue era uma solução tampão preparada com cloridrato de Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris HCl, Sigma-Aldrich) 100 mmol L<sup>-1</sup> e o pH desta solução era ajustado a 8,5 unidades com uma solução de hidróxido de sódio 2 mol L<sup>-1</sup> (Pronalab).

A solução de POD (EC 1.11.1.7, HRP da espécie *Amoracia rusticana*, do tipo VI-A, com actividade específica de 1280 U mg<sup>-1</sup> de sólido, Sigma-Aldrich) 10 U mL<sup>-1</sup> era preparada diariamente na solução tampão por diluição apropriada da respectiva solução mãe, a qual era estável ao longo de 1 mês quando armazenada a 4°C.

A solução mãe do reagente quimiluminogénico 3-aminofthalhidrazida (luminol, Sigma) de concentração 10 mmol L<sup>-1</sup> era preparada dissolvendo a quantidade apropriada na solução tampão e armazenada a 4°C. A solução de trabalho de luminol (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) era preparada diariamente por diluição apropriada da solução mãe na solução tampão.

A solução de peróxido de hidrogénio (2,0 mmol L<sup>-1</sup>) era preparada diariamente por diluição apropriada da solução comercial 30% (v/v) (Panreac) na solução tampão.

As soluções padrão de fenol (Sigma) e dos derivados fenólicos (2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2,3-dimetilfenol, 3,4-dimetilfenol, ácido gálgico e ácido tânico, Sigma) eram preparadas diariamente na solução tampão ou numa solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) 25% (v/v) para os compostos com baixa solubilidade em água.

Todas estas soluções eram protegidas da luz no decorrer dos ensaios.

Para a determinação do teor de polifenóis em vinhos, foram utilizadas como amostras diferentes tipos de vinho espanhóis (branco, tinto e rosé) e um extracto alcoólico (50% (v/v)) de grainhas de uvas.

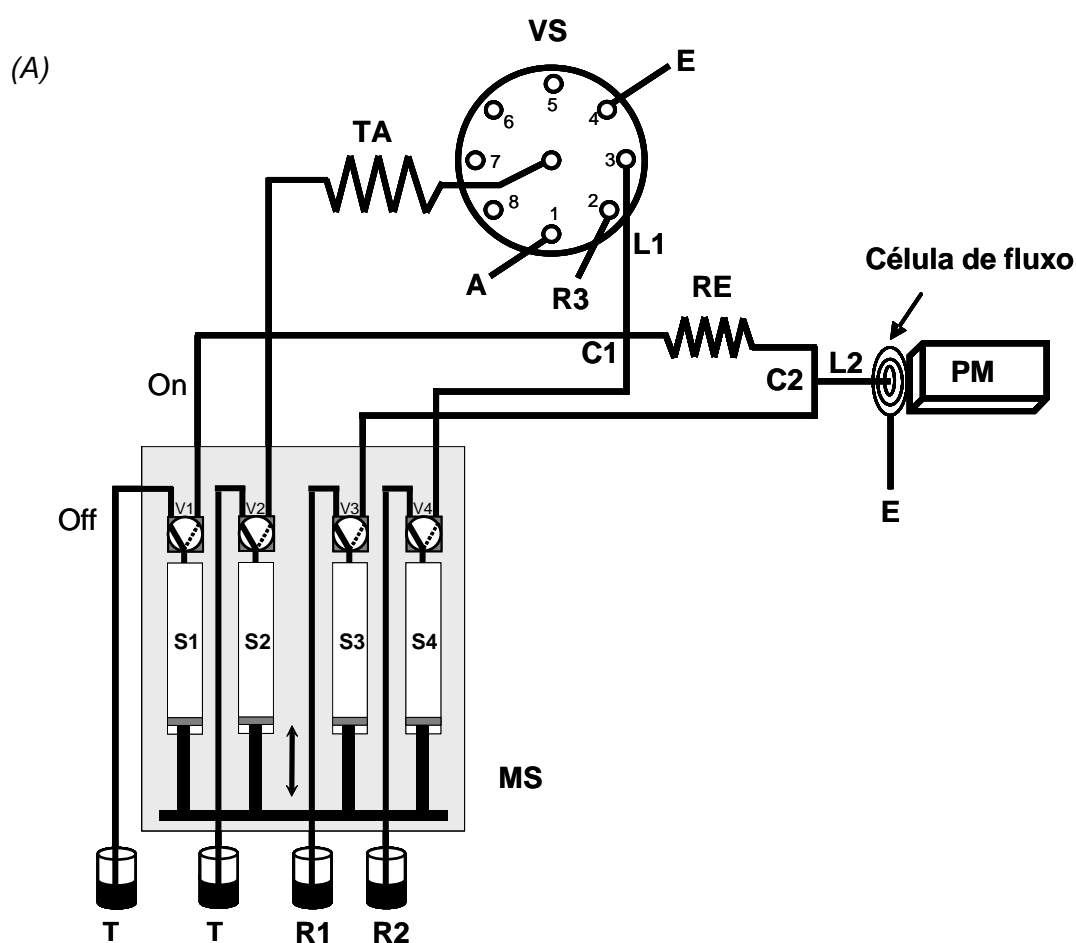
Para a determinação do teor de fenol em águas, foram utilizadas águas de origens diferentes: água da torneira, de poço e lixiviados. A água da torneira foi colhida na Universidade das Ilhas Baleares (Espanha). As águas de poço e lixiviados foram colhidas nas imediações de diferentes estações de tratamento de resíduos sólidos urbanos (Ilhas Baleares).

### 7.2.2. Aparelhagem

O sistema automático de fluxo desenvolvido para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -POD encontra-se representado na Figura 7.1.

O tubo de armazenamento, ligado à seringa 2 (S2, Figura 7.2.), apresentava um comprimento de 2,5 m com diâmetro interno de 1,5 mm. A tubagem entre os frascos dos reagentes e as seringas apresentavam também um diâmetro interno de 1,5 mm, para evitar contrapressão ou vácuo para caudais elevados. O reactor apresentava um comprimento de 100 cm com configuração em figuras de oito. O tubo de reacção para a reacção de QL antes da sua detecção apresentava um comprimento de 4 cm.

Todos os outros componentes constantes da montagem (Figura 7.1.), designadamente multisseringa, válvula selectora de fluidos, luminómetro e sistema de aquisição, foram previamente descritos no Capítulo 2.



(B)



**Figura 7.1.** (A) Representação esquemática do módulo analítico desenvolvido para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -POD: **MS** – Módulo de multisseringa; **S1-S4** – Seringas ( $\text{S1} = 10 \text{ mL}$ ,  $\text{S2} = \text{S3} = 5 \text{ mL}$ ,  $\text{S4} = 1 \text{ mL}$ ); **V1-V4** – Válvulas solenóides de três vias; **C1 e C2** – Confluências; **VS** – Válvula selectora de fluidos; **TA** – Tubo de armazenamento; **RE** – Reactor; **L1 e L2** – Tubagem de ligação (20 e 4 cm); **PM** – Fotomultiplicador; **T** – Solução transportadora de tampão Tris HCl  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  pH 8,5; **R1** – Solução de luminol  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ; **R2** – Solução de POD  $10 \text{ U mL}^{-1}$ ; **R3** – Solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ; **A** – Amostra; **E** – Esgoto. As opções de comutação das válvulas solenóides foram classificadas com as linhas “On/Off”. A linha “Off” correspondia ao reservatório das soluções e a linha “On” dizia respeito à rede de fluxo. As setas indicam o movimento do pistão. (B) Fotografia da montagem desenvolvida.

### 7.2.3. Metodologias convencionais de comparação

Para a avaliação da exactidão dos resultados fornecidos pela metodologia SIA-MSFIA, determinou-se o teor de polifenóis e de fenol em amostras de índole alimentar e ambiental recorrendo às metodologias de referência, método de Folin-Ciocalteu (FC) [12] e da 4-aminoantipirina [13], respectivamente.

O método de FC adoptado incluía um período de incubação de 30 minutos da amostra de vinho e do reagente de FC em meio carbonatado antes da leitura espectrofotométrica a  $750 \text{ nm}$  [12]. Para a quantificação foi utilizada uma curva de calibração com uma solução de ácido tânico nas seguintes concentrações: 100, 200, 300,

400, 500 e 600 mg L<sup>-1</sup> (Abs (U.A.) = 0,00086 (±0,00004) C<sub>Ácido tânico</sub> (mg L<sup>-1</sup>) + 0,015 (±0,016), R<sup>2</sup>=0,9988). O teor de polifenóis totais foi expresso em mg de ácido tânico/L.

No caso do método da 4-aminoantipirina era efectuada uma destilação prévia da amostra de água para eliminação de interferentes, seguido do método fotométrico directo. Este último consistia na reacção do fenol com a 4-aminoantipirina, a pH alcalino, na presença do hexacianoferrato(III) de potássio e, após um período de incubação de 15 minutos, fazia-se a leitura espectrofotométrica a 500 nm [13]. Para a quantificação foi utilizada uma curva de calibração com uma solução de fenol nas seguintes concentrações: 1, 2, 3, 4 e 5 mg L<sup>-1</sup> (Abs (U.A.) = 0,151 (±0,005) C<sub>Fenol</sub> (mg L<sup>-1</sup>) + 0,002 (±0,016), R<sup>2</sup>=0,9997).

#### 7.2.4. Procedimento experimental

O procedimento analítico efectuado no sistema SIA-MSFIA para a determinação quimiluminimétrica do efeito dos diferentes compostos fenólicos no sistema luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD encontra-se representado na Tabela 7.1. Assim, no início de cada ciclo eram aspirados sequencialmente segmentos de amostra e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o TA através da válvula de selecção (etapas 3-8). Após inversão do sentido de fluxo, o conjunto destas zonas era propulsionado até ao reactor, com preenchimento do tubo L1 (etapa 10) seguido da limpeza do sistema por propulsão do transportador (etapa 11). Depois a zona de amostra e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 µL) e a enzima POD (40 µL) eram dispensadas simultaneamente para o reactor (RE, Figura 7.1. A), ocorrendo a reacção em linha favorecida por um período de paragem de 30 segundos (etapa 13). Posteriormente, esta zona reaccional era misturada na confluência C2 com a solução de luminol, a um caudal total de 45 mL min<sup>-1</sup>, com consequente aquisição do sinal de QL obtido (etapas 14-17). O ciclo terminava com a limpeza das diferentes linhas da montagem e o enchimento das seringas com os reagentes respectivos com V1-V4 off. Este ciclo era repetido 4 vezes para cada amostra.

O sinal de branco era obtido pela aspiração de água (ou DMSO:água 25:75 (v/v), no caso dos compostos fenólicos menos solúveis em água) em substituição da amostra. O potencial efeito exibido pelos diferentes compostos fenólicos testados no sistema de QL descrito era então estimado através do aumento ou da diminuição da intensidade de QL emitida relativamente ao sinal de branco, tendo por base de comparação o composto fenólico mais simples, o fenol.

**Tabela 7.1.** Procedimento analítico efectuado na montagem SIA-MSFIA para a avaliação do efeito de diferentes derivados fenólicos no sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD

Etapa	Instrumento	Protocolo <sup>a</sup>	Descrição
1		<i>Iniciar loop: amostra</i>	
2	Multisseringa	Dispensar 2000 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 off, V3 off e V4 off	Ajuste da posição da bomba de pistão
3		<i>Iniciar loop: inserção da amostra</i>	
4	Válvula de selecção	Válvula na posição 1	
5	Multisseringa	Carregar 100 µL a 2 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 on, V3 off e V4 off	Aspiração de uma alíquota de amostra (50 µL) para o TA
6	Válvula de selecção	Válvula na posição 2	
7	Multisseringa	Carregar 100 µL a 2 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 on, V3 off e V4 off	Aspiração de uma alíquota de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (50 µL) para o TA
8		<i>Repetir 4 vezes o loop: inserção da amostra</i>	
9	Válvula de selecção	Válvula na posição 3	
10	Multisseringa	Dispensar 300 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 on, V3 off e V4 off	Preenchimento do tubo L1
11	Multisseringa	Dispensar 1000 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 on, V2 off, V3 off e V4 off	Lavagem do sistema com o transportador
12	Multisseringa	Dispensar 400 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 on, V3 off e V4 on	Mistura da amostra e do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (200 µL) com a peroxidase (40 µL) no reactor
13	-	Tempo de espera de 30 s	Período de paragem de 30 s
14	Detector de QL	Aquisição do sinal analítico (Ganho=1000)	Medir a cada 0,10 s
15	Multisseringa	Dispensar 1000 µL a 30 mL min <sup>-1</sup> com V1 on, V2 off, V3 on e V4 off	Mistura do segmento amostra, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e peroxidase com o luminol e consequente reacção de QL
16	Multisseringa	Dispensar 1000 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 on, V3 on e V4 off	
17	Detector de QL	Parar a aquisição do sinal analítico	
18	Multisseringa	Dispensar 1000 µL a 5 mL min <sup>-1</sup> com V1 on, V2 off, V3 off e V4 off	Lavagem do sistema com o transportador
19	Multisseringa	Carregar as seringas a 15 mL min <sup>-1</sup> com V1 off, V2 off, V3 off e V4 off	Ajuste da posição da bomba de pistão
20		<i>Repetir 4 vezes do loop: amostra</i>	

<sup>a</sup> Os caudais e os volumes indicados referem-se à seringa 1 (10 mL)

### 7.3. Resultados e sua discussão

#### 7.3.1. Optimização do sistema

A reacção de emissão de luz pelo luminol [14] envolve a oxidação do luminol em meio alcalino, produzindo 3-aminofalato no estado excitado o qual emite radiação. Na reacção de QL do luminol o oxidante mais utilizado é o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no entanto oxidantes como o permanganato, hipoclorito ou iodo também podem ser usados. A reacção é catalisada por iões metálicos como Fe (II), Cu (II), Co (II), ferrocianeto, alguns metalocomplexos (hemina, hemoglobina) e enzimas (peroxidases) [15].

O módulo analítico com vista ao estudo do comportamento dos derivados fenólicos no sistema luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -POD foi desenvolvido tendo em conta dois aspectos importantes: a reacção em linha do derivado fenólico com o oxidante  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o catalisador peroxidase e a subsequente reacção com o luminol na etapa de detecção. Encontra-se descrito que os intermediários de POD oxidada formados na reacção com o derivado fenólico e o substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisam a oxidação do luminol e a consequente produção de radicais de luminol com um tempo de vida curto [16]. Desta forma, um indutor irá acelerar a formação destes radicais de luminol através da sua reacção com os intermediários de POD [17].

O procedimento analítico adoptado envolveu a optimização de diferentes parâmetros que influenciam o desempenho do sistema, tais como o volume de amostra, a estratégia de amostragem, o caudal durante a etapa de detecção, o período de paragem no tubo de reacção bem como as concentrações dos reagentes. O principal objectivo consistiu no estabelecimento de condições que conduzissem a um compromisso entre a magnitude do sinal analítico de branco (na ausência do derivado fenólico) e a diferença de intensidade de QL obtida com o branco e o derivado fenólico, uma vez que com o método proposto pode haver uma potenciação ou uma inibição da resposta de QL.

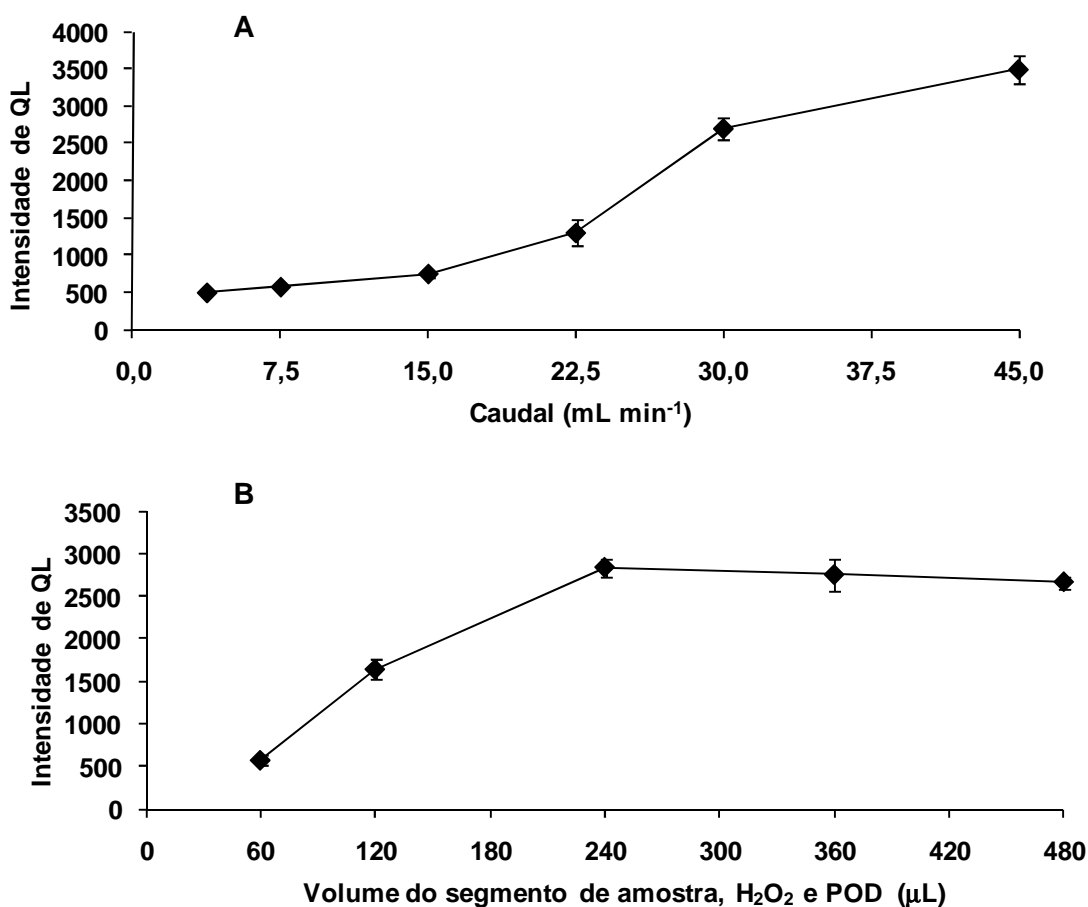
##### 7.3.1.1. Parâmetros físicos

Nas reacções de QL desenvolvidas em sistemas de fluxo, o caudal é um parâmetro crítico, uma vez que afecta não só o tempo de reacção mas também o tempo de residência da zona de reacção na célula de fluxo. As reacções de QL derivadas da oxidação do luminol exibem uma velocidade de reacção elevada e como tal devem ser efectuadas a caudais muito elevados para permitirem uma aquisição adequada da resposta quimiluminescente pelo fotomultiplicador, o qual deve estar o mais junto possível da confluência C2, como demonstra a Figura 7.2. A. Assim, os caudais totais



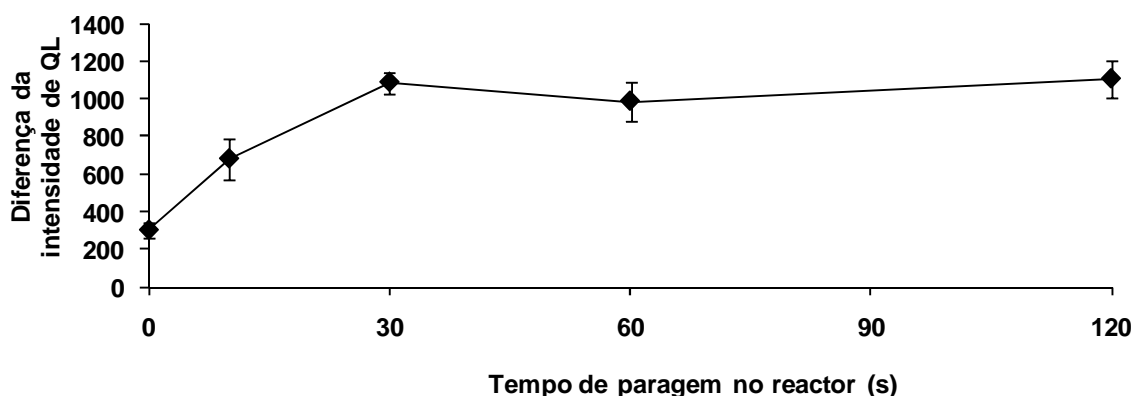
empregues na etapa de detecção (Tabela 7.1, etapa 15) variaram entre 3,75 e 45 mL  $\text{min}^{-1}$ , sendo que um caudal total de propulsão de 45 mL  $\text{min}^{-1}$  (correspondente ao caudal máximo resultante da activação simultânea de S1/V1 e S3/V3) foi escolhido para as experiências posteriores. Verificou-se que caudais baixos conduziam a uma diminuição drástica da sensibilidade.

O volume total de amostra, peróxido de hidrogénio e POD propulsionados para o reactor (RE, Figura 7.1. A) foi estudado entre 60 e 480  $\mu\text{L}$  (Figura 7.2. B). Este volume era definido pela activação simultânea de S2/V2 e S4/V4 e como tal, por exemplo, um volume total igual a 60  $\mu\text{L}$  correspondia a 50  $\mu\text{L}$  da mistura incubada de amostra e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 10  $\mu\text{L}$  da enzima POD. A intensidade de QL emitida aumentou com o volume até 240  $\mu\text{L}$ . Para volume superiores, os picos eram mais largos mas a intensidade de QL máxima era similar dado que a diluição desta mistura devido ao fenómeno de dispersão era desprezável. Desta forma, foi adoptado um volume de 240  $\mu\text{L}$  para este segmento de mistura reaccional no reactor para os ensaios seguintes.



**Figura 7.2.** Estudo da influência do caudal durante a etapa de detecção (A) e do volume de amostra,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e POD injectado no reactor (B) no sinal analítico obtido (intensidade de QL). Condições experimentais:  $\text{H}_2\text{O}_2$  1,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ , luminol 0,1 mmol  $\text{L}^{-1}$  e POD 10 U  $\text{mL}^{-1}$ .

Uma estratégia de paragem de fluxo no RE foi também estudada para promover a reacção entre o derivado fenólico, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a POD, induzindo a formação de intermediários de POD oxidada que irão reagir com o luminol. Com um período de paragem de 30 segundos, a diferença de intensidade de QL emitida entre o branco e o derivado fenólico aumentou cerca de 3,5 vezes e manteve-se constante para tempos de paragem superiores (Figura 7.3.). Assim, foi implementada uma paragem de fluxo de 30 segundos.

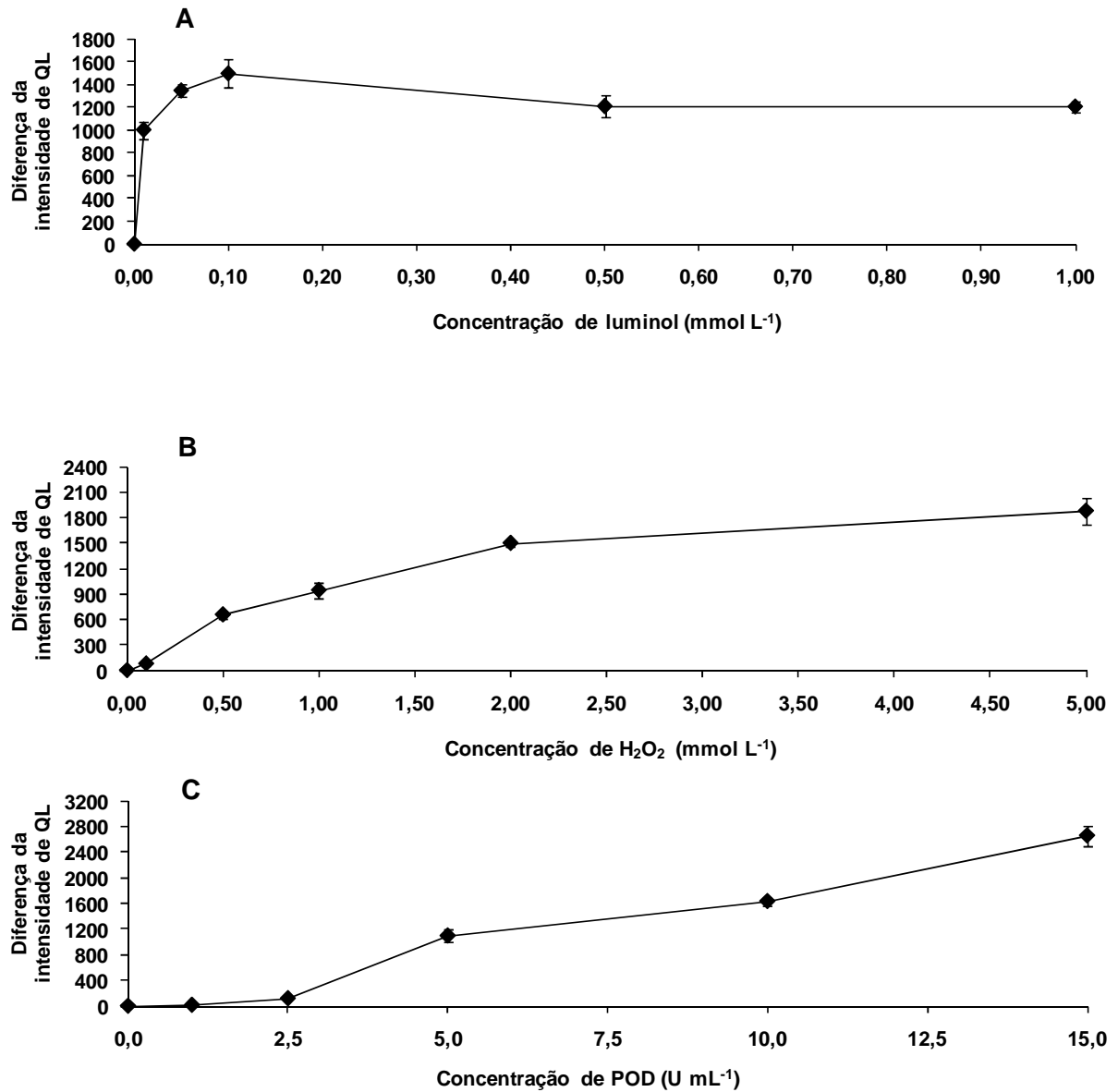


**Figura 7.3.** Estudo da influência do tempo de paragem de fluxo no reactor no sinal analítico obtido. Condições experimentais:  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , luminol  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , POD  $10 \text{ U mL}^{-1}$  e fenol  $1 \text{ mg L}^{-1}$ .

### 7.3.1.2. Parâmetros químicos

A influência da concentração dos diferentes reagentes envolvidos na diferença de intensidade de QL obtida (Figura 7.4.) foi estudada nos intervalos de concentração de  $1,0 \times 10^{-2}$  -  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  para a 3-aminofthalhidrazida (A),  $0,1$  -  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  para o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (B) e  $1$  -  $15 \text{ U mL}^{-1}$  para a POD (C). Em todos os casos, a diferença de intensidade de QL emitida aumentava com o aumento da concentração dos reagentes até que era atingida uma estabilização. Desta forma, foram escolhidas como concentrações óptimas  $0,1$  e  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de luminol e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , respectivamente, que proporcionavam melhores coeficientes de variação e o mínimo consumo de reagentes. No caso do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o aumento da intensidade de QL registado para concentrações superiores a  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  não justificava o seu uso (Figura 7.4. B). No caso da POD, a qual constitui um dos catalisadores mais poderosos das reacções de QL [18], foi adoptada a concentração igual a  $10 \text{ U mL}^{-1}$  como

um compromisso entre a diferença de intensidade de QL dos sinais de branco e de amostra e a própria magnitude do sinal de branco.

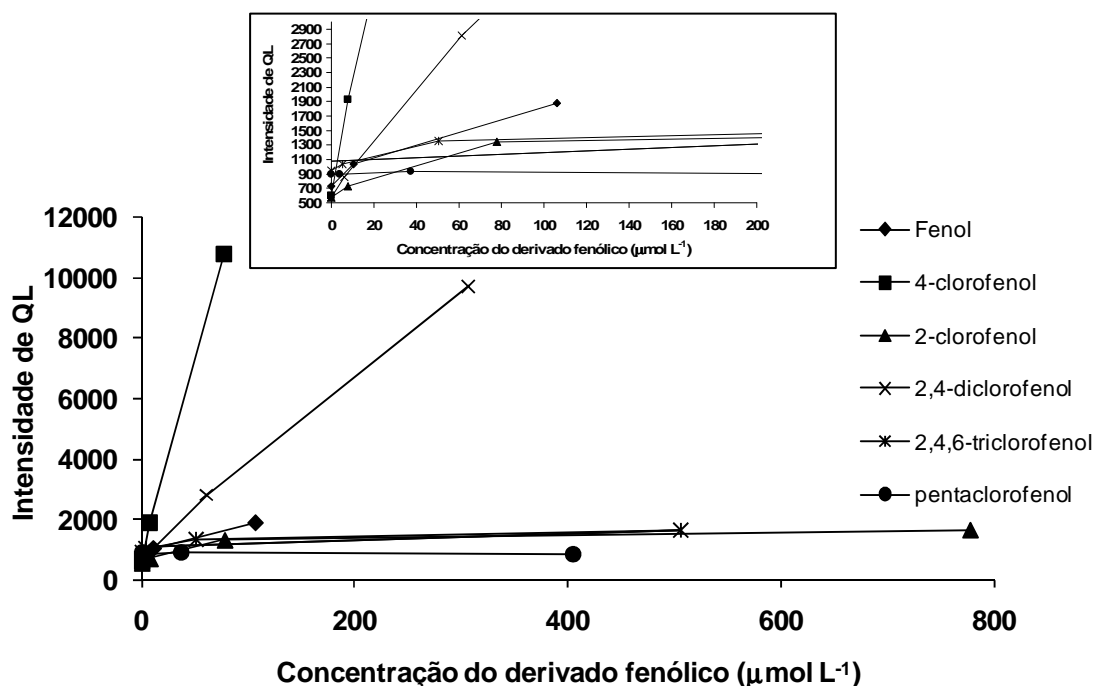


**Figura 7.4.** Estudo da influência da concentração dos reagentes na diferença da intensidade de QL: (A) luminol; (B)  $\text{H}_2\text{O}_2$  e (C) POD.

### 7.3.2. Aplicação da metodologia SIA-MSFIA desenvolvida à avaliação do efeito dos derivados fenólicos sobre o sistema luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD

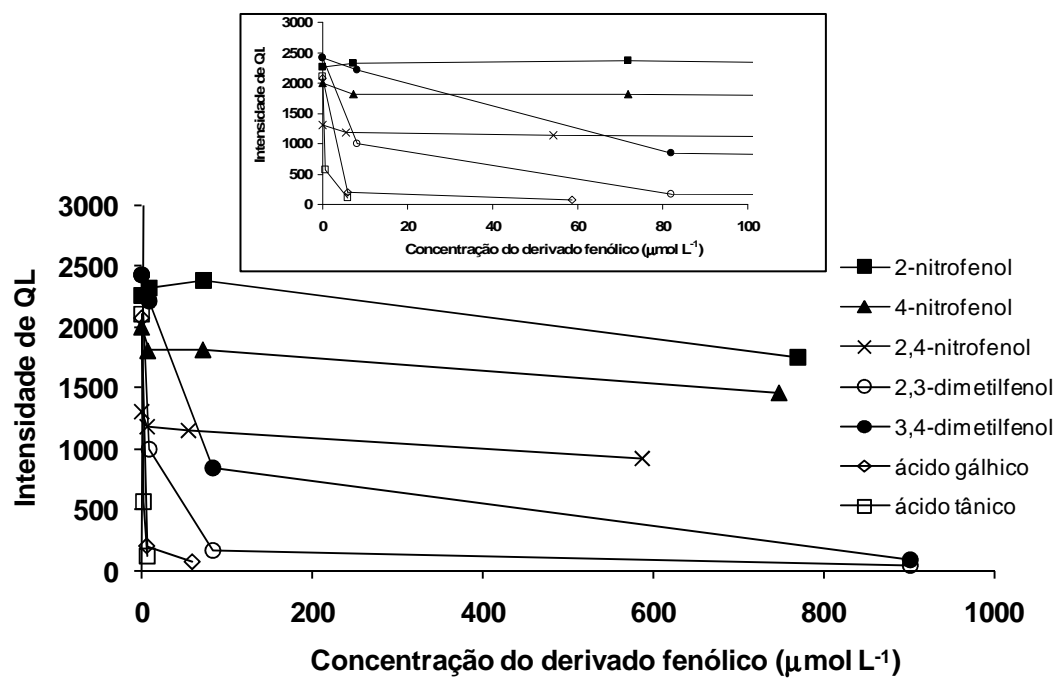
O procedimento SIA-MSFIA desenvolvido foi aplicado ao fenol e aos seus derivados, tais como clorofenóis, nitrofenóis, metilfenóis e polifenóis (Tabela 7.2.).

Os diferentes compostos fenólicos foram testados no intervalo de 1 a 100 mg L<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos demonstraram que o fenol e os clorofenóis exibem um efeito indutor da resposta de QL (Figura 7.5.), como reportado anteriormente com metodologias discretas [1, 2, 19]. O efeito do fenol no mesmo sistema de QL potenciado pelo *p*-iodofenol foi estudado e da pré-incubação da POD com o fenol em baixas concentrações resultou igualmente uma potenciação da resposta QL [19]. Adicionalmente, o pentaclorofenol não exerceu qualquer efeito no sistema de QL (Figura 7.5.). De facto, geralmente os halogéneos diminuem a intensidade de QL [20]. O 4-clorofenol foi o derivado fenólico que apresentou uma maior eficiência de potenciação. Por outro lado, alguns clorofenóis apresentam baixa solubilidade em água e desse modo o uso de solventes orgânicos como metanol ou DMSO é aconselhado. Deste modo, foi avaliada a influência de diferentes misturas (v/v) de metanol ou DMSO na performance da reacção de QL. Assim, com o procedimento descrito e nas condições optimizadas, o sinal de branco obtido com água foi relacionado com o atingido com diferentes concentrações de metanol e DMSO desde 25 a 100% (v/v). A taxa de inibição foi maior para o metanol comparativamente ao DMSO, resultando por exemplo numa diminuição da resposta de QL de 94% para uma solução de metanol 100% (v/v) contra 68% para DMSO 100% (v/v). Neste sentido, como compromisso entre a solubilidade dos compostos ensaiados e a interferência na metodologia, a concentração máxima de DMSO usada para a solubilização do 2,4,6-triclorofenol e do pentaclorofenol foi igual a 25% (v/v). Neste contexto, é de realçar a actividade enzimática remanescente da peroxidase neste ambiente misto aquoso-orgânico, mesmo não se encontrando imobilizada, o que reforça o facto de esta enzima apresentar uma capacidade intrínseca para manter-se numa conformação cataliticamente activa em meios reaccionais adversos [21].



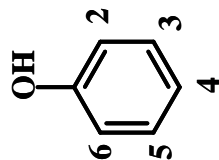
**Figura 7.5.** Avaliação do efeito de potenciação do fenol e dos clorofenóis sobre o sistema luminol- $H_2O_2$ -POD.

Relativamente aos nitrofenóis, dimetilfenóis e polifenóis, estes actuam como inibidores da resposta de QL (Figura 7.6.). O derivado fenólico 3,4-dimetilfenol, aqui descrito como inibidor, foi apontado como indutor num trabalho em modo discreto [2]. Por outro lado, os ácidos gálico e tânico apresentaram um efeito de potenciação no sistema de QL luminol- $H_2O_2$  catalisado pelo cobalto [22]. O subgrupo dos polifenóis apresentou a maior eficiência de inibição seguido do subgrupo dos metilfenóis. Adicionalmente, o 2-nitrofenol e o 4-nitrofenol apenas exerceram efeito inibitório para concentrações iguais ou superiores a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .



**Figura 7.6.** Avaliação do efeito de inibição dos nitrofenóis, dimetilfenóis e polifenóis sobre o sistema luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -POD.

**Tabela 7.2.** Avaliação do comportamento de diversos compostos fenólicos no sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD



Composto fenólico	Estrutura					Efeito quimiluminescente
	C2	C3	C4	C5	C6	
Fenol						Indutor
2-Clorofenol	Cl					Indutor
4-Clorofenol			Cl			Indutor
2,4-Diclorofenol	Cl		Cl			Indutor
2,4,6-Triclorofenol <sup>a</sup>	Cl		Cl		Cl	Indutor
Pentaclorofenol <sup>a</sup>	Cl	Cl	Cl	Cl	Cl	Sem efeito
2-Nitrofenol	NO <sub>2</sub>					Inibidor <sup>b</sup>
4-Nitrofenol			NO <sub>2</sub>			Inibidor <sup>b</sup>
2,4-Dinitrofenol	NO <sub>2</sub>		NO <sub>2</sub>			Inibidor
2,3-Dimetilfenol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>				Inibidor
3,4-Dimetilfenol		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>			Inibidor
Ácido gálico						Inibidor
Ácido tânico						Inibidor

<sup>a</sup> Dissolvidos em DMSO:água (25:75)

<sup>b</sup> Para concentrações iguais ou superiores a 100 mg L<sup>-1</sup>

### **7.3.3. Determinação do teor de compostos fenólicos em matrizes alimentar e ambiental**

O efeito exibido pelo conjunto de compostos fenólicos testados sobre o sistema de QL estudado permitiu aplicar a metodologia na análise de amostras de natureza alimentar (vinhos) e ambiental (águas).

A determinação dos polifenóis totais é uma prática analítica comum e é normalmente apresentada como um índice, em vez da análise individual dos diferentes compostos polifenólicos recorrendo ao HPLC [23]. De facto, o estudo de grupos de compostos heterogéneos quer em termos de estrutura química quer em termos de concentração e reactividade tem merecido especial ênfase em relação à análise individual [24]. Na realidade, do primeiro resulta um conhecimento rápido e eficiente quanto ao controlo de qualidade alimentar na monitorização de compostos prevalentes bem como quanto à ocorrência de contaminantes no campo ambiental, como é o caso do grupo dos compostos fenólicos.

Nos últimos anos têm sido reportados métodos baseados em técnicas de fluxo, com diferentes tipos de detecção, para a determinação do teor de polifenóis totais em vinhos [25]. Estes métodos baseiam-se normalmente numa reacção de oxidação-redução entre os compostos redutores presentes nos vinhos e um reagente oxidante, como permanganato de potássio em meio ácido, complexos de tungstato-molibdato ou o catião radical ABTS. Também têm sido descritos métodos amperométricos. A Tabela 7.3. apresenta uma selecção de métodos de fluxo com vista à determinação da capacidade antioxidante em vinhos.



**Tabela 7.3.** Métodos automáticos para a determinação do teor de polifenóis totais/capacidade antioxidante em vinhos

Metodologia de fluxo	Sistema de detecção	Ensaio	Ritmo de determinação (h <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Ref.
FIA	QL	Oxidação com permanganato de potássio em meio ácido	120	<0,8	[26]
FIA	QL	Sistema luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -cobalto	-	<2,4	[27]
SIA	Espectrofotometria (Visível)	Reacção de Folin-Ciocalteu	-	<5,6	[28]
FIA	Espectrofotometria (Visível)	Reacção com o catião radical ABTS	120	<5,0	[29]
MSFIA	Espectrofotometria (Visível)	Reacção de Folin-Ciocalteu	12	<1,3 ; < 4,0	[30, 31]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Reacção electroquímica	-	-	[32]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Reacção electroquímica	-	<7,0	[33]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Reacção bienzimática (GOD e POD) e formação do catião radical ABTS	-	-	[34]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Biosensor de lacase	-	-	[35]

No presente estudo, os polifenóis demonstraram um efeito inibidor da resposta de QL inequívoco (Figura 7.7. A), cujo comportamento no sistema de QL utilizado foi descrito pela primeira vez, que permite que o teor de polifenóis em amostras alimentares possa ser determinado. A curva de calibração típica foi  $1/QL = 0,00176 (\pm 0,00002) C_{\text{Ácido tânico}} (\text{mg L}^{-1}) + 0,00062 (\pm 0,00003)$ ,  $R^2=0,9997$ , com intervalo de resposta linear entre 0,01-5  $\text{mg L}^{-1}$  de ácido tânico. As amostras eram então diluídas para ajustar as concentrações reais de polifenóis presentes nas amostras ao intervalo de resposta linear do método. De forma a avaliar a exactidão do método desenvolvido, os resultados obtidos por análise de quatro amostras de vinhos e uma de grainhas de uvas no sistema SIA-MSFIA foram comparados com os fornecidos pela metodologia de referência (método de FC) [12]. Os desvios relativos entre os resultados obtidos pela metodologia de fluxo e de comparação situaram-se entre 2,63 e 6,64 % (Tabela 7.4.).

**Tabela 7.4.** Resultados obtidos pela metodologia de fluxo e pela metodologia de referência para a determinação de ácido tânico em vinhos e grainhas de uva

Amostras	Metodologia proposta	Método de referência	Desvio relativo (%)
	Ácido tânico ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Ácido tânico ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
Vinho branco 1	349,8 ( $\pm 8,5$ )	362,2 ( $\pm 10,9$ )	- 3,42
Vinho branco 2	344,2 ( $\pm 32,9$ )	353,5 ( $\pm 1,3$ )	- 2,63
Vinho tinto	1937,3 ( $\pm 77,7$ )	1816,6 ( $\pm 47,6$ )	+ 6,64
Vinho rosé	439,0 ( $\pm 23,3$ )	457,0 ( $\pm 40,1$ )	- 3,94
Grainhas de uva <sup>a</sup>	1222,4 ( $\pm 95,8$ )	1272,3 ( $\pm 156,3$ )	- 3,92

<sup>a</sup> Extracto alcoólico (50% (v/v)) de grainhas de uva [36]

Os resultados obtidos por aplicação das metodologias a amostras alimentares foram ainda confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear entre as duas metodologias, do tipo  $C_{\text{SIA-MSFIA}} (\text{mg L}^{-1}) = -48,896 (\pm 144,817) + 1,065 (\pm 0,140) C_{\text{Método de referência}} (\text{mg L}^{-1})$ ,  $r=0,9975$  e por aplicação do teste  $t$  de Student ( $t_{\text{calculado}} 0,21$ ;  $t_{\text{tabelado}}$

2,78). Ambos os testes confirmaram a concordância entre os dois métodos, para um nível de confiança de 95 %.

Por outro lado, o efeito indutor da resposta de QL apresentado pelo derivado fenólico mais simples (Figura 7.7. B) foi também explorado para a monitorização de contaminantes e avaliação de risco no campo ambiental. Os fenóis são poluentes comuns em efluentes aquosos resultantes de descargas ilegais de processos industriais e também como produtos de degradação de pesticidas [37] e nesse sentido a monitorização deste tipo de analito reveste-se de extrema importância. Deste modo, foi efectuada a determinação do teor de fenol em amostras de água fortificadas.

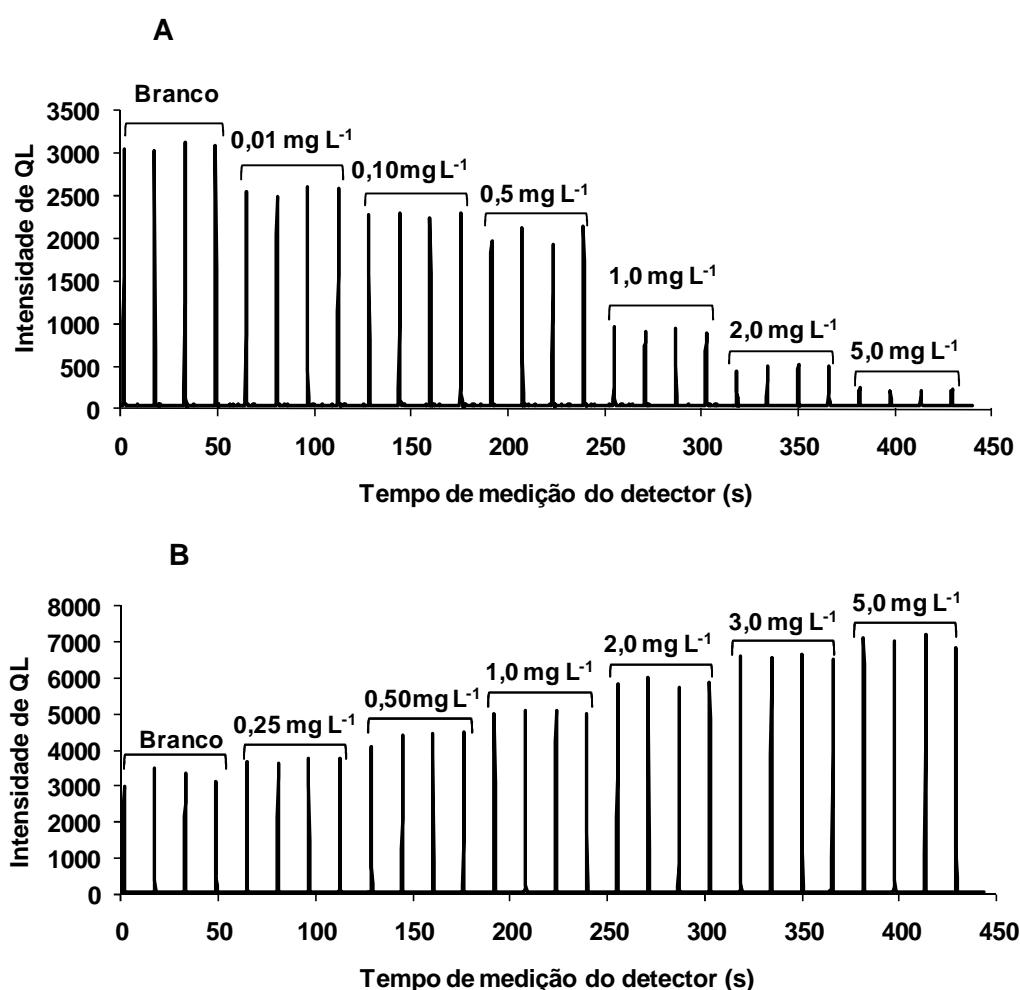
Nas condições optimizadas, o logaritmo da intensidade de QL emitida foi relacionado com o logaritmo da concentração de fenol ( $\log QL = 0,2348 (\pm 0,0051) \log C_{\text{Fenol}} (\text{mg L}^{-1}) + 3,7069 (\pm 0,0023)$ ,  $R^2=0,9981$ ) com intervalo de resposta linear até 5 mg L<sup>-1</sup> de fenol. Finalmente, de forma a averiguar a exactidão do método desenvolvido, submeteram-se 6 amostras de água de diferente origem (águas corrente, de poço e lixiviado) à análise paralela pelo método proposto e pela metodologia de referência (método da 4-aminoantipirina) [13]. Os resultados encontram-se na Tabela 7.5. e como se pode observar os desvios relativos entre os resultados obtidos pela metodologia de fluxo e de comparação foram inferiores a 4%.

**Tabela 7.5.** Resultados obtidos pela metodologia de fluxo e pela metodologia de referência para a determinação de fenol em amostras de água fortificadas

Amostras	Metodologia proposta	Método de referência	Desvio relativo (%)
	Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	Fenol (mg L <sup>-1</sup> )	
Água da torneira	1,80 (± 0,22)	1,87 (± 0,08)	- 3,72
Água de poço 1	0,49 (± 0,04)	0,51 (± 0,01)	- 2,62
Água de poço 2	1,56 (± 0,10)	1,53 (± 0,07)	+ 1,84
Água de poço 3	1,40 (± 0,12)	1,40 (± 0,04)	- 0,09
Lixiviado 1	1,25 (± 0,08)	1,27 (± 0,01)	- 1,61
Lixiviado 2	1,05 (± 0,19)	1,03 (± 0,04)	+ 2,18

Neste caso, os resultados obtidos por aplicação das metodologias a amostras de água foram também confirmados pelo estabelecimento de uma regressão linear entre as duas metodologias, do tipo  $C_{\text{SIA-MSFIA}} (\text{mg L}^{-1}) = 0,026 (\pm 0,131) + 0,972 (\pm 0,098) C_{\text{Método de referência}} (\text{mg L}^{-1})$ ,  $r=0,9974$  e por aplicação do teste  $t$  de Student ( $t_{\text{calculado}} 0,62$ ;  $t_{\text{tabelado}} 2,57$ ). Ambos os testes confirmaram a concordância entre os dois métodos, para um nível de confiança de 95 %.

Quando as amostras de água contiverem uma variedade de compostos fenólicos (por exemplo, no caso de águas residuais), o método desenvolvido deve ser acoplado a uma técnica de separação (por exemplo, HPLC) devido ao comportamento dualístico (indutor ou inibidor) dos diferentes derivados fenólicos no sistema de QL estudado.



**Figura 7.7.** Registo dos sinais analíticos obtidos para a solução de branco e soluções padrão de ácido tânico (A) e fenol (B) e respectivas concentrações.

Relativamente à repetibilidade do procedimento SIA-MSFIA, foram determinados valores de RSD de 3,4 e 5,2% para padrões de fenol com concentração igual a 0,25 mg L<sup>-1</sup> e de ácido tânico 2 mg L<sup>-1</sup>.

O tempo requerido para completar um ciclo analítico foi de 400 segundos, o que corresponde a cerca de 9 determinações por hora, e representa uma notável melhoria na eficiência e rapidez quando comparado com os métodos de referências respectivos [12, 13]. Na verdade, o método de FC inclui um período de incubação de 30 minutos antes da leitura no espectrofotómetro [12] e no método da 4-aminoantipirina é necessário um procedimento de pré-tratamento da amostra (destilação), seguido de um período de incubação de 15 minutos e da subsequente medição espectrofotométrica, resultante da condensação oxidativa da 4-aminoantipirina com o fenol catalisada pelo hexacianoferrato (III) de potássio em meio alcalino [13].

No que respeita à determinação do teor de polifenóis totais em vinhos, os sistemas de fluxo baseados em FIA [26, 27, 29, 32-35] permitem a sua análise de modo automático e rápido, mas apresentam como desvantagem o consumo elevado de reagentes. Dois dos sistemas FIA, baseados na oxidação com permanganato de potássio em meio ácido (pH 2) [26] e na “captação” do catião radical ABTS [29] permitiram um ritmo de determinação de 120 amostras por hora, mas os reagentes fluem em contínuo. Adicionalmente, os sistemas baseados nas metodologias de gestão de fluidos mais recentes [28, 30, 31] foram desenhados para a automatização do método discreto de FC e resultaram no desenvolvimento de sistemas mais versáteis e com redução efectiva no consumo de amostra e reagentes, apesar de proporcionarem baixos ritmos de amostragem. No caso dos sistemas MSFIA desenvolvidos para o efeito [30, 31], a frequência analítica era de 12 amostras por hora.

No que respeita à determinação do teor de fenol em águas, têm sido propostos igualmente sistemas de fluxo baseados em diferentes técnicas, acoplados a diferentes sistemas de detecção (Tabela 7.6.). A maioria dos métodos foram desenhados para permitir a automatização do método discreto da 4-aminoantipirina [38-40] e nalguns foi implementada uma etapa de extracção em fase sólida prévia à própria determinação [41], que permitiu um aumento notável da sensibilidade e da selectividade, com uma inevitável redução do ritmo de determinação. Têm sido igualmente propostos métodos quimiluminimétricos, baseados na oxidação do luminol [42, 43] e na oxidação com permanganato de potássio em meio ácido [44]. Recentemente, foi reportado um sistema hifenizado MSFIA-cromatografia líquida (CL) [45] que permitia a discriminação de vários derivados fenólicos, com ritmos de determinação entre 4 (volume de amostra igual a 100 mL) e 10 (volume de amostra igual a 25 mL) amostras por hora. Também têm sido descritos métodos amperométricos, caracterizados por elevados ritmos de amostragem [46, 47].

Tabela 7.6. Métodos automáticos para a determinação do teor de fenol em águas

Metodologia de fluxo	Sistema de detecção	Ensaio	Ritmo de determinação (h <sup>-1</sup> )	RSD (%)	Ref.
FIA	QL	Extração em fase sólida e reacção com luminol- hexacianoferrato (III) de potássio	<6	1,5	[43]
FIA	Espectrofotometria (Visível)	Reacção da 4-aminoantipirina e da 3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona (MBTH)	60	<3,0	[38]
FIA	Espectrofotometria (Visível)	Extração em fase sólida e reacção da 4-aminoantipirina	12	2,4	[41]
SIA	Espectrofotometria (Visível)	Reacção da 4-aminoantipirina	12	2,1	[39]
Multicomutação	Espectrofotometria (Visível)	Reacção da 4-aminoantipirina	90	0,6	[40]
Multicomutação	Espectrofotometria (Visível)	Reacção de Berthelot (nitroprussiato de sódio/cloridrato de hidroxilamina)	65	0,5	[48]
MSFIA-CL	Espectrofotometria (Ultravioleta)	Extração em fase sólida e separação cromatográfica	4 ou 10	≤8,0	[45]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Reacção electroquímica	70	2,8	[46]
FIA	Electroquímica (amperometria)	Reacção electroquímica	180	2,1	[47]

#### **7.4. Conclusões**

A metodologia SIA-MSFIA desenvolvida constitui uma estratégia valiosa para a avaliação do comportamento dos compostos fenólicos sobre o sistema de QL luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-POD.

Esta metodologia combina o uso da válvula selectora de fluidos para a aspiração do composto fenólico e da solução oxidante e subsequente incubação desta mistura com o catalisador peroxidase, para a geração em linha de espécies oxidadas, e do módulo de multisseringa como ferramenta de gestão de fluidos nas operações de MSFIA-QL.

Os diferentes subgrupos de compostos fenólicos exibiram uma resposta diferenciada perante o sistema de QL estudado, exercendo um efeito indutor ou inibidor sobre este. Deste modo, a metodologia proposta pode ser uma escolha para a avaliação de potenciais activadores ou inibidores das reacções de QL baseadas na oxidação do luminol, biocatalisada pela POD.

O método SIA-MSFIA proposto foi depois aplicado à determinação do índice de polifenóis e do teor de fenol em amostras de vinhos e águas, respectivamente, e os resultados obtidos demonstraram que este procedimento pode constituir uma alternativa face aos métodos existentes. Neste sentido, a metodologia de fluxo proposta representa uma ferramenta para a determinação do teor polifenólico em amostras alimentares como monitorização do controlo de qualidade, bem como na estimação do risco/contaminação na análise de águas.

## 7.5. Referências bibliográficas

- [1] Diaz AN, Sanchez FG, Garcia JAG. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-horseradish peroxidase system: Comparative studies. *Anal Chim Acta* 1996 Jun 28; 327 (2): 161-5.
- [2] Diaz AN, Sanchez FG, Garcia JAG. Phenol derivatives as enhancers and inhibitors of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-horseradish peroxidase chemiluminescence. *J Biolumin Chemilumin* 1998 Mar-Apr; 13 (2): 75-84.
- [3] Sanchez FG, Diaz AN, Bracho V, Aguilar A, Algarra M. Automated determination of asulam by enhanced chemiluminescence using luminol/peroxidase system. *Luminescence* 2009 Nov-Dec; 24 (6): 448-52.
- [4] Sanchez FG, Diaz AN, Tellez CD, Algarra M. Determination of asulam by fast stopped-flow chemiluminescence inhibition of luminol/peroxidase. *Talanta* 2008 Oct 15; 77 (1): 294-7.
- [5] Ma YT, Cheung PCK. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods - A comparison of structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 2007 May 16; 55 (10): 4222-8.
- [6] Fellenberg G. Introdução aos problemas da poluição ambiental. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária (EPU) - Springer; 1980.
- [7] Miniotti KS, Georgiou CA. High throughput flow injection bioluminometric method for olive oil antioxidant capacity. *Food Chem* 2008 Jul 15; 109 (2): 455-61.
- [8] Diaz AN, Bracho V, Algarra M, Sanchez F. Chemiluminometric Determination of the Pesticide Pirimicarb by a Flow Injection Analysis Assembly. *Anal Lett* 2008; 41 (17): 3210-20.
- [9] Maya F, Estela JM, Cerda V. Improving the chemiluminescence-based determination of sulphide in complex environmental samples by using a new, automated multi-syringe flow injection analysis system coupled to a gas diffusion unit. *Anal Chim Acta* 2007 Oct 3; 601 (1): 87-94.
- [10] Maya F, Estela JM, Cerda V. Interfacing on-line solid phase extraction with monolithic column multisyringe chromatography and chemiluminescence detection: An effective tool



for fast, sensitive and selective determination of thiazide diuretics. *Talanta* 2010 Jan 15; 80 (3): 1333-40.

[11] García-Campaña AM, Baeyens WRG. *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 2001.

[12] *Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts* - Office International de la Vigne et du Vin (OIV): Paris 1990. p. 269.

[13] Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater*. 20th ed. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (APHA–AWWA–WPFC); 1998.

[14] Albrecht HO. *Z Phys Chem* 1928; 136: 321.

[15] Marques KL. *Novos sistemas de fluxo contínuo para a automatização da análise quimiluminométrica de produtos farmacêuticos [dissertação]*. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2006.

[16] Easton PM, Simmonds AC, Rakishev A, Egorov AM, Candeias LP. Quantitative model of the enhancement of peroxidase-induced luminol luminescence. *J Am Chem Soc* 1996 Jul 17; 118 (28): 6619-24.

[17] Lundin A, Hallander LOB. Mechanisms of horseradish peroxidase catalysed luminol reaction in presence and absence of various enhancers. In: Scholmerich J, Andreesen R, Kapp A, Ernst M, Wood WG, editors. *Bioluminescence and chemiluminescence: new perspectives*. Chichester: Wiley 1987. p. 555.

[18] Marquette CA, Blum LJ. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal Bioanal Chem* 2006 Jun; 385 (3): 546-54.

[19] Ilyina AD, Hernandez JLM, Benavides JEM, Lujan BHL, Bogatcheva ES, Garcia JR, et al. Determination of phenol using an enhanced chemiluminescent assay. *Luminescence* 2003 Jan-Feb; 18 (1): 31-6.

[20] Kuroda N, Kai M, Nakashima K. *Chemiluminescence Detection in Liquid Chromatography*. In: García-Campaña AM, W.R.G. B, editors. *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 2001. p. 404.

- [21] Araujo A, Saraiva M, Lima J. Flow Injection Analysis with Immobilized Enzymes in Nonaqueous Media. *Curr Anal Chem* 2010 Jul; 6 (3): 193-202.
- [22] Cui H, Shi MJ, Meng R, Zhou J, Lai CZ, Lin XQ. Effect of pH on inhibition and enhancement of Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Co<sup>2+</sup> chemiluminescence by phenolic compounds and amino acids. *Photochem Photobiol* 2004 Mar; 79 (3): 233-41.
- [23] Harkensee D, Beutel S, Young M, Ulber R. Development of a fast spectroscopic enzyme assay for on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine. *Anal Bioanal Chem* 2006 Feb; 384 (4): 1013-8.
- [24] Baena JR, Valcarcel M. Total indices in analytical sciences. *Trends Anal Chem* 2003 Oct; 22 (10): 641-6.
- [25] Magalhaes LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity. *Talanta* 2009 Mar 15; 77 (5): 1559-66.
- [26] Costin JW, Barnett NW, Lewis SW, McGillivray DJ. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta* 2003 Dec 4; 499 (1-2): 47-56.
- [27] Popa CV, Danet AF, Jipa S, Zaharescu T. Determination of Total Antioxidant Activity of Wines Using a Flow Injection Method with Chemiluminescence Detection. *Rev Chim-Bucharest* 2010 Jan; 61 (1): 11-6.
- [28] Moreno CL, Rudner PC, Garcia JMC, Pavon JMC. Development of a sequential injection analysis device for the determination of total polyphenol index in wine. *Microchim Acta* 2004 Sep; 148 (1-2): 93-8.
- [29] Labrinea EP, Georgiou CA. Rapid, fully automated flow injection antioxidant capacity assay. *J Agric Food Chem* 2005 Jun 1; 53 (11): 4341-6.
- [30] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC, Rangel AOSS. Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. *J Agric Food Chem* 2006 Jul 26; 54 (15): 5241-6.
- [31] Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC, Toth IV, Rangel AOSS. Automatic flow system for sequential determination of ABTS(center dot+) scavenging capacity and

Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. *Anal Chim Acta* 2007 Jun 5; 592 (2): 193-201.

[32] Mannino S, Brenna O, Buratti S, Cosio MS. A new method for the evaluation of the 'antioxidant power' of wines. *Electroanalysis* 1998 Oct; 10 (13): 908-12.

[33] Blasco AJ, Rogerio MC, Gonzalez MC, Escarpa A. "Electrochemical Index" as a screening method to determine "total polyphenolics" in foods: A proposal. *Anal Chim Acta* 2005 May 10; 539 (1-2): 237-44.

[34] Milardovic S, Kerekovic I, Rumenjak V. A flow injection biampereometric method for determination of total antioxidant capacity of alcoholic beverages using bienzymatically produced ABTS(center dot+). *Food Chem* 2007; 105 (4): 1688-94.

[35] Di Fusco M, Tortolini C, Deriu D, Mazzei F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta* 2010 Apr 15; 81 (1-2): 235-40.

[36] Nawaz H, Shi J, Mittal GS, Kakuda Y. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Sep Purif Technol* 2006 Mar; 48 (2): 176-81.

[37] Sax NI. *Dangerous Properties of Industrial Materials*. 2nd ed. New York: Reinhold; 1993.

[38] Frenzel W, Oleksyfrenzel J, Moller J. Spectrophotometric Determination of Phenolic-Compounds by Flow-Injection Analysis. *Anal Chim Acta* 1992 May 25; 261 (1-2): 253-9.

[39] Lapa RAS, Lima JLFC, Pinto IVOS. Simultaneous determination of nitrite, nitrate, sulphate and phenolic compounds, by sequential injection analysis, in wastewaters. *Analisis* 2000 May; 28 (4): 295-301.

[40] Lupetti KO, Rocha FRP, Fatibello O. An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. *Talanta* 2004 Feb; 62 (3): 463-7.

[41] Song WL, Zhi ZL, Wang LS. Amberlite XAD resin solid-phase extraction coupled on-line to a flow injection approach for the rapid enrichment and determination of phenols in water and waste waters. *Talanta* 1997 Aug; 44 (8): 1423-33.

[42] Gong ZJ, Huang YM, Zhang ZJ. Determination of phenol in water by flow-injection chemiluminescence analysis. *Chin J Anal Chem* 2002 Sep; 30 (9): 1123-5.

- [43] Qi HL, Lv JG, Li BX. Determination of phenol at  $\text{ng L}^{-1}$  level by flow-injection chemiluminescence combined with on-line solid-phase extraction. *Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc* 2007 Apr; 66 (4-5): 874-8.
- [44] Corominas BGT, Mateo JVG, Zamora LL, Calatayud JM. Determination of phenol by preconcentration-direct chemiluminescence in a FIA assembly. *Anal Lett* 2005; 38 (3): 499-510.
- [45] Oliveira HM, Segundo MA, Lima J, Cerda V. Multisyringe flow injection system for solid-phase extraction coupled to liquid chromatography using monolithic column for screening of phenolic pollutants. *Talanta* 2009 Feb; 77 (4): 1466-72.
- [46] Kojlo A, Wolyniec E, Michalowski J. Flow-injection biamprometry of phenol. *Anal Lett* 2000; 33 (2): 237-48.
- [47] Zhao C, Song JF, Zhang JC. Determination of total phenols in environmental wastewater by flow-injection analysis with a biamprometric detector. *Anal Bioanal Chem* 2002 Oct; 374 (3): 498-504.
- [48] Rodenas-Torralba E, Morales-Rubio A, de la Guardia M. Determination of phenols in waters using micro-pumped multicommutation and spectrophotometric detection: an automated alternative to the standard procedure. *Anal Bioanal Chem* 2005 Sep; 383 (1): 138-44.

## CAPÍTULO 8

---

Conclusões gerais



Os sistemas de análise por injeção sequencial desenvolvidos permitiram a automatização de determinações enzimáticas de diferentes parâmetros de interesse em matrizes de índole diversa como clínico, farmacêutico, alimentar e ambiental.

Em qualquer dos casos foram obtidas montagens de configuração simples, que permitiram a redução efectiva dos volumes de enzima(s), amostra e outros reagentes envolvidos com subsequente minimização dos efluentes gerados e uma diminuição do tempo de análise e da intervenção do operador. Isto tornou as determinações mais económicas, rápidas e menos sujeitas a erros induzidos pelo operador. Adicionalmente, o controlo computadorizado dos sistemas de fluxo desenvolvidos acrescenta-lhes flexibilidade, permitindo a fácil alteração das condições de análise sem reconfiguração física dos sistemas. Assim, sistemas com estas características podem ser aplicados na análise de diferentes espécies e distintos tipos de amostra, com base em reacções diversas e envolvendo uma gama ampla de intervenções sobre a zona de amostra, sem que para isso seja necessário alterar a configuração do sistema analítico, bastando uma simples alteração no teclado do computador.

A aplicação analítica das montagens apresentadas permitiu confirmar a adequabilidade da técnica SIA à automatização de métodos baseados em reacções enzimáticas, desde a determinação do substrato, produto ou de efectores, a implementação de um esquema de amplificação da resposta enzimática, estudos de indução e inibição enzimática até à avaliação da actividade enzimática através da determinação dos parâmetros cinéticos. O modo de funcionamento dos sistemas SIA facilita a gestão e direccionamento das soluções, abrindo inúmeras possibilidades em termos de manipulação das zonas de enzima(s), substrato(s) e dos outros reagentes e na detecção do produto final das reacções envolvidas. Por outro lado, a elevada versatilidade e robustez inerente à técnica SIA permitiu a incorporação de diversos dispositivos para a realização de procedimentos complexos de manipulação e de pré-tratamento da amostra dentro do sistema, que conduziram a um aumento expressivo das potencialidades analíticas das montagens.

O elevado grau de especificidade e selectividade com que as enzimas exercem a catálise foi evidenciado na determinação da GSH e da GSSG em amostras de sangue total, com a utilização da enzima GR dada a complexidade inerente a esta amostra biológica. Por outro lado, o ensaio de regeneração DTNB-GR empregue, que permitiu uma amplificação da resposta à glutatona, confirmou a exequibilidade dos sistemas SIA para a automatização de reacções enzimáticas envolvendo mais de três reagentes. O modo de funcionamento da válvula selectora de fluidos, elemento central dos sistemas SIA desenvolvidos, tornou possível a implementação de um procedimento de diluição em linha, com a colocação de um tubo de diluição numa das portas da válvula, que permitiu a

aplicação da metodologia à determinação das concentrações de GSH e GSSG presentes em intervalos distintos nas amostras de sangue humano.

A associação de uma válvula de injeção ao sistema SIA viabilizou o desenvolvimento de uma estratégia de amostragem directa das amostras de biodiesel, sem qualquer tratamento prévio. Com a incorporação de uma unidade de extracção membranar e a conjugação com um período de paragem do escoamento, foi possível efectuar de forma simples a extracção do metanol das amostras de biodiesel para o canal aceitador da unidade e permitir a sua determinação em meio aquoso. Esta estratégia de extracção e a utilização de um sistema SIA híbrido permitiu uma redução efectiva no consumo de solventes orgânicos e, consequentemente, uma diminuição da geração de efluentes, o que constitui uma alternativa ambientalmente amigável no âmbito da Química Verde.

Na automatização da reacção enzimática da determinação do metanol, apresentou-se uma configuração que empregava enzimas livres em solução e imobilizadas e dispostas em reactores empacotados. A opção da forma de utilização da enzima esteve relacionada com as características da própria enzima e com o tipo de estabilidade que esta apresenta nas duas situações. A imobilização enzimática da AOD conduziu a um aumento da sua estabilidade operacional, permitindo a sua reutilização contínua. Adicionalmente demonstra-se no mesmo sistema o emprego de uma enzima livre em solução, a POD, de baixo custo.

A estratégia adoptada de confluência de zonas garantiu a mistura completa do peróxido de hidrogénio obtido na reacção catalisada pela AOD e do reagente de desenvolvimento de cor. Com a introdução de uma válvula solenóide, antes do ponto de confluência, num canal secundário da bomba peristáltica, conseguiu-se coordenar o escoamento nos canais principal e secundário e simplificar o sistema de fluxo.

O desenvolvimento e estudo da reacção da  $PLA_2$  foram possíveis com a incorporação de duas câmaras de mistura num sistema SIA. A acção mecânica exercida pela movimentação da barra magnética e o período de paragem de escoamento permitiram a mistura efectiva da solução de lipossomas de natureza viscosa bem como a criação de condições favoráveis ao desenvolvimento da reacção catalítica seleccionada. O modo de funcionamento da válvula selectora facilitou a gestão das soluções envolvidas nas reacções ao permitir a aspiração faseada das diferentes zonas e a sua introdução nas câmaras de mistura na altura propícia. O posicionamento da câmara, apoiada numa entrada lateral da válvula, facilitou a optimização do volume de envio para o detector e permitiu controlar de forma eficaz a razão sinal /sinal de branco bem como a limpeza da própria câmara, evitando qualquer contaminação do canal principal. Por outro lado, o modo de funcionamento dos sistemas SIA possibilitou o controlo independente de duas



câmaras de mistura e, desta forma, permitiu a automatização de todo o procedimento analítico com vista à avaliação do efeito dos AINEs sobre a actividade da PLA<sub>2</sub> e a sua rentabilização, uma vez que a incubação dos lipossomas com a sonda ANS na câmara de mistura principal era efectuada enquanto a incubação do AINE com a enzima decorria na outra câmara.

O sistema desenvolvido permitiu a realização de estudos de modulação da actividade enzimática sobre os lipossomas na interface água-fosfolípido e evidenciou este sistema microheterogéneo como sendo um potencial meio reaccional de biocatálise para a avaliação de novos agentes anti-inflamatórios.

A manipulação fluidica estrita e o controlo preciso das condições reaccionais com a metodologia SIA, assegurando a reprodutibilidade dos períodos de tempo de envio para o detector e de monitorização do sinal analítico, foram testados com sucesso na avaliação da actividade da enzima tirosinase, no meio reaccional contendo LI, através da determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_M^{ap}$  e  $V_{max}^{ap}$ ). A interferência da viscosidade do LI no grau de mistura das soluções aspiradas bem como na detecção espectrofotométrica foi eliminada graças aos volumes reduzidos empregues e ao controlo exímio da dispersão conseguido com a metodologia SIA. A utilidade dos LIs como meio reaccional de biocatálise alternativo aos solventes orgânicos foi confirmada com o emprego de um substrato com baixa solubilidade em água. Adicionalmente, os estudos de inibição enzimática efectuados parecem fornecer informações sobre o mecanismo da reacção catalisada pela tirosinase, nomeadamente apontando para modificações no ambiente reaccional induzidas pelo LI.

A utilização da multisseringa como dispositivo de propulsão num sistema SIA permitiu confirmar as vantagens desta combinação aquando da implementação da reacção quimiluminimétrica à base de luminol, ao possibilitar uma mistura rápida e reprodutível entre a amostra e o reagente quimiluminogénico numa zona imediatamente anterior à célula de fluxo. A configuração do sistema de fluxo permitiu a criação de condições favoráveis para a formação de intermediários de POD oxidada, catalisadores da produção de radicais de luminol, após a mistura em confluência da zona da POD com a zona de amostra e peróxido de hidrogénio. O facto de ter sido obtida uma resposta diferenciada, de indução ou de inibição, perante o sistema de QL dos diferentes compostos fenólicos testados, permite antever a sua aplicação na avaliação de outros potenciais activadores ou inibidores deste tipo de reacções de QL biocatalisadas, mesmo apresentando baixa solubilidade em água.

Os ensaios de precisão efectuados revelaram valores de desvio padrão relativo sempre inferiores a 5,2 %, demonstrando um comportamento satisfatório em todas as situações analíticas estudadas. De facto, a associação dos diferentes dispositivos à

válvula selectora e a utilização da bomba peristáltica ou da multisseringa como unidade de propulsão não afectaram a repetibilidade dos volumes aspirados bem como o comportamento geral dos sistemas resultantes.

Os resultados obtidos, por aplicação das metodologias desenvolvidas às matrizes respectivas, foram em todos os casos estatisticamente concordantes com os fornecidos pelo método de referência aplicável ou pelo convencional de comparação adoptado, quando estes existiam.

As metodologias desenvolvidas demonstraram ser alternativas vantajosas às metodologias de referência ou de comparação, as quais são geralmente laboriosas e demoradas, com um elevado grau de dependência do operador e envolvendo por vezes a utilização de produtos químicos tóxicos. Pelo contrário, de um modo geral os sistemas desenvolvidos são dotados de grande simplicidade, versatilidade, flexibilidade e grau de automatização, possibilitando a adaptação a diversas situações analíticas e procedimentos de manipulação da amostra, bem como a associação a diferentes sistemas de detecção.

Os trabalhos desenvolvidos, no âmbito desta dissertação, ilustraram as vantagens recíprocas entre a utilização das enzimas e a metodologia SIA, quer em ensaios de rotina quer em estudos sistemáticos. Destacou-se, neste contexto, a extrema importância da incorporação de processos biocatalíticos em módulos analíticos SIA, com vista ao desenvolvimento de metodologias enzimáticas automáticas que constituíam alternativas válidas, economicamente viáveis e com ritmos de amostragem adequados à rotina laboratorial das diferentes áreas a que se aplicaram as metodologias. Para cada situação analítica, foram optimizadas as condições de operação para as diferentes enzimas, incluindo a escolha do meio reaccional adequado, que permitissem a execução dos ensaios enzimáticos com elevados graus de eficiência, reprodutibilidade e precisão. Da associação da biocatálise com a estratégia de fluidos da técnica SIA utilizadas resultou a extensão dos campos de aplicação, para além do meio aquoso. Assim, foram exploradas a biocatálise em sistemas microheterogéneos, nomeadamente em estudos enzimáticos na interface lípido-água usando lipossomas como modelos membranares, e em meios não-aquosos, como sendo os meios mistos envolvendo solventes orgânicos ou líquidos iónicos.

De facto, um dos mais recentes desenvolvimentos prende-se com o estudo do comportamento das enzimas em meios aquo-restritos, designadamente nos líquidos iónicos, como ambiente reaccional de biocatálise promissor face aos solventes orgânicos. Por outro lado, antevê-se que a adopção de sistemas miniaturizados aliados a novas tecnologias enzimáticas (como as aplicações com nanopartículas ou filmes microfluídicos) se traduzirá numa enorme rentabilização das metodologias, ao permitir

uma redução acentuada das quantidades de substrato(s), enzima(s) e outros reagentes (cofactores, activadores, inibidores, etc) e de solventes empregues e desta forma oferecer um ambiente reaccional confinado favorável à catálise enzimática, além de conduzir a um aumento da rapidez do processo analítico.